

**Titre:** Optimisation de la croissance de cellules HEK293 exprimant la  
**Title:** pyruvate carboxylase dans un bioréacteur en mode cuvée-  
alimentée

**Auteur:** Cédric Vallée  
**Author:**

**Date:** 2013

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Vallée, C. (2013). Optimisation de la croissance de cellules HEK293 exprimant la  
**Citation:** pyruvate carboxylase dans un bioréacteur en mode cuvée-alimentée [Mémoire de  
maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
<https://publications.polymtl.ca/1183/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:**  
**PolyPublie URL:** <https://publications.polymtl.ca/1183/>

**Directeurs de  
recherche:** Olivier Henry  
**Advisors:**

**Programme:** Génie chimique  
**Program:**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

OPTIMISATION DE LA CROISSANCE DE CELLULES HEK293 EXPRIMANT  
LA PYRUVATE CARBOXYLASE DANS UN BIORÉACTEUR EN MODE  
CUVÉE-ALIMENTÉE

CÉDRIC VALLÉE

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)

AOÛT 2013

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

OPTIMISATION DE LA CROISSANCE DE CELLULES HEK293 EXPRIMANT  
LA PYRUVATE CARBOXYLASE DANS UN BIORÉACTEUR EN MODE  
CUVÉE-ALIMENTÉE

présenté par : VALLÉE Cédric

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., président

M. HENRY Olivier, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre

## DÉDICACE

« Nothing worth knowing can be understood with the mind. Everything really valuable has to enter you through a different opening, if you'll forgive the disgusting imagery »

*Woody Allen, Manhattan*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Olivier pour son soutien et ses précieux conseils au cours de mon projet. Il a su me diriger dans les moments d'égarements et me motiver à progresser lorsque j'en avais le plus besoin. Merci aussi à Zahra qui m'a appris les rudiments du métier et surtout à être zen et à relaxer en manipulant des cellules et beaucoup de bonheur avec ta nouvelle famille.

Merci, également à Hugo avec qui j'ai eu la chance de découvrir et partager les particularités des pointilleuses cellules HEK, sa contribution fût essentielle à ce mémoire. À Constance, Kim, Alexander et Emil que j'ai eu le plaisir de superviser, j'ai adoré travailler avec vous et transmettre une part de mes connaissances.

Merci, à mes compagnons de laboratoire que j'aimais tant soustraire à leur tâche pour leur permettre de rire un peu (s'applique surtout pour Atefeh). Merci à Ines pour ses anecdotes savoureuses sur les dangers des animaux sauvages. Du coup, j'aimerais aussi remercier Charles, Sam, Fred et Benoît pour m'avoir inculqué un peu de leur culture quoi. Un merci particulier à July pour les moments intrépides au laboratoire ainsi que ses conseils avisés sur la vie de couple et les chats de Bengale. Merci à Loïc et Julien de m'avoir si bien entouré pendant tout ce temps. Un petit mot, pour Alex pour la création d'un babillard fou et son support en début de projet. Merci à Claudia, Nesrine, Xinhe Zhao, Xiaojie Ren et aux autres membres du groupe pour leur bonne humeur et leur dynamisme.

Merci à ma famille et mes amis d'avoir compris que je devais souvent sacrifier mes journées de congé pour prendre mener à bien mes expériences. Merci à ma sœur de m'avoir invité à souper quand je n'avais plus rien à manger. Merci, aussi à mère qui m'encourage tant malgré les épreuves qu'elle traverse elle-même.

Enfin, je remercie Ali qui a partagé l'ensemble des aléas de ce projet avec moi. Merci, d'avoir été auprès de moi au laboratoire pendant Noël sous 45 centimètres de neige et de m'avoir accompagné pendant des soirées complètes à compter des cellules. J'espère pouvoir partager encore beaucoup de projets avec toi.

## RÉSUMÉ

La demande pour les produits biopharmaceutiques ne cesse d'augmenter. Le processus de développement des bioprocédés se doit d'être rapide afin de pouvoir procéder rapidement aux essais cliniques dans le domaine. De plus, les coûts de production doivent être suffisamment bas pour permettre un coût raisonnable de vente. La majorité des molécules biologiques sont actuellement produites dans des cellules mammifères. Ces cellules sont toutefois caractérisées par un métabolisme lent, de faibles densités cellulaires atteintes en culture et conduisent à des concentrations en produit de l'ordre de quelques grammes par litre dans les meilleurs cas. Les cellules HEK293 sont une plateforme de production avantageuse de par leur origine humaine qui leur permet d'exprimer des protéines recombinantes comportant des modifications post-traductionnelles très similaires à celles présentes chez l'homme. La culture en mode cuvée est limitée par la quantité de nutriments disponible ce qui mène à de faibles concentrations finales en produit d'intérêt. La cuvée-alimentée est le mode de culture dominant dans l'industrie biopharmaceutique, car il est simple, flexible et la mise à l'échelle en est relativement aisée. Ce mode consiste à procéder à des ajouts en cours de culture de façon à maintenir des concentrations non limitantes de nutriments dans le milieu de culture, ce qui a généralement pour effet d'augmenter la durée des cultures et la concentration finale de produit. Par contre, cela entraîne invariablement l'accumulation de déchets métaboliques, qui constituent généralement le frein principal des cultures en mode cuvée-alimentée. Par le biais de l'ingénierie cellulaire, la production de ces métabolites néfastes peut toutefois être réduite en manipulant les voies métaboliques. Ainsi, des cellules HEK293 exprimant la pyruvate carboxylase et produisant de l'interféron- $\alpha 2\beta$  ont été utilisées dans le cadre de ce projet. L'objectif principal était de maximiser la croissance de ces cellules et le rendement des cultures en développant une stratégie cuvée-alimentée. Des cultures en flacons en mode batch ont tout d'abord permis de mettre en évidence les différences métaboliques entre la lignée parentale (293-D9) et la lignée exprimant la pyruvate carboxylase (293-F5). Tel qu'attendu, les taux de consommation du glucose et de la glutamine ainsi que le taux de production du lactate ont été réduits de façon significative dans le cas des cellules 293-F5. De plus, la concentration cellulaire maximale atteignait le double de celle observée avec les cellules parentales. Des cultures à petite échelle ont permis d'établir que l'emploi d'une solution d'alimentation commerciale (Efficientfeed, Invitrogen Life Technology), couplée à l'ajout de glutamine, s'avérait la combinaison la plus apte à maximiser la croissance

cellulaire parmi les conditions testées. En appliquant une stratégie de contrôle prédictif en flacons, la concentration maximale de cellules 293-F5 a été encore augmentée à près de  $10 \times 10^6$  cells/ml en plus de prolonger le maintien de la viabilité cellulaire. Pour les cellules 293-D9, la phase de croissance exponentielle n'a pas été prolongée et les effets ont été limités à une augmentation de la longévité de la culture. Malgré tout, la concentration finale d'interféron est demeurée plus élevée pour l'ensemble des cultures réalisées avec la lignée parentale, la productivité spécifique de ces cellules s'avérant supérieure. Par la suite, des expériences batch en bioréacteur ont permis d'obtenir une concentration cellulaire maximale 1,4 fois supérieure pour les cellules exprimant la PYC. La viabilité de la culture a été maintenue 2,5 jours de plus, ce qui s'est toutefois traduit par une augmentation modeste (7%) de la concentration finale d'interféron. Enfin, le maintien d'un point de consigne sur la concentration de glucose en implantant une boucle de contrôle complètement automatisée a permis d'optimiser davantage la croissance et la production. Pour les cellules 293-F5, la stratégie appliquée a conduit à une concentration cellulaire maximale de  $10,7 \times 10^6$  cellules/ml et la quantité cumulative de biomasse (intégrale de la concentration de cellules viables) était 2 fois plus élevée que celle de la culture en mode cuvée. La concentration finale de produit a atteint 160 mg/L ce qui représente une amélioration d'un facteur 4 par rapport au mode batch pour le même clone (61 mg/L) ainsi que pour la lignée parentale (57 mg/L). Le même protocole d'alimentation appliqué aux cellules parentales a eu un effet néfaste sur la production, probablement causé par l'inhibition du lactate qui a atteint une concentration très élevée dans ce cas. Des études dans la littérature ont associé l'expression de l'enzyme PYC avec une activité accrue du cycle de Krebs. Toutefois, des taux de consommation spécifique d'oxygène similaires entre les deux lignées ont été mesurés, suggérant que l'effet de la PYC sur le métabolisme se limite surtout au niveau des réactions cytosoliques.

## ABSTRACT

The market for biologics is growing fast. To meet this increasing demand, bioprocess development must allow to produce sufficient material for clinical trials or the market in a timely and cost effective manner. Most biologics are currently produced in mammalian cells because they are able to produce correctly folded and glycosylated proteins. However, animal cells exhibit low product yields due to lower cell density and productivity. The human origin of HEK293 cells makes them an advantageous production platform for recombinant protein production as they can perform proper post-translational modifications. In industrial bioprocesses, fed-batch is widely used because it is simple, flexible and easily scalable. Foremost, by maintaining cell viability for extended periods of time and avoiding nutrient depletion, higher product titer can be achieved. Waste metabolite accumulation is the main limitation in most fed-batch cultures. In order to reduce lactate and ammonia production, metabolic engineering can be used. In this thesis, HEK293 cells stably producing interferon- $\alpha 2\beta$  and further engineered to overexpress yeast pyruvate carboxylase were used. The aim was to maximize cell growth by using fed-batch technology.

Batch shake flask cultures were conducted with both cell lines to serve as controls and also to highlight the main differences between the parental (293-D9) and PYC expressing (293-F5) clones. A marked reduction of glucose and glutamine uptake, as well as a decrease of lactate production were observed for PYC expressing cells. Maximum cell density was also increased 2-fold compared to parental cells. Of all the feeding solutions tested, the commercially available Effecientfeed (Invitrogen Life Technology) solution supplemented with glutamine led to the highest increase in cell growth and was used thereafter. A simple predictive control strategy in shake flasks increased the maximum cell density up to  $10 \times 10^6$  cells/ml and extended culture longevity. In the case of parental cells, only minor improvements of cell growth were observed, but cell viability was maintained longer. The increase in growth did not, however, translate to a higher product titer. A bioreactor experiment carried out in batch mode led to a 1.4-fold increase in maximum cell density and the culture duration was extended by 2.5 days for PYC expressing cells compared to 293-D9. These combined factors led to a negligible increase in product titer by 7%. Significant increases in cell growth and production concentration were achieved when glucose was maintained at a set-point by an automatic control loop for the metabolically-



engineered cells. In contrast, under the same conditions, parental cells produced less recombinant protein despite a similar growth curve when compared to batch. The lower product titer was most likely caused by the high lactate concentrations observed in this case, creating unfavorable conditions for production. For 293-F5 cells, the strategy yielded 160 mg/L of interferon mainly resulting from a 2-fold increase of the integral of viable cells (IVC) when compared to the batch process. The bioreactor run was therefore able to produce 260% more recombinant protein than the initial shake flask control in batch. The metabolism of PYC expressing cells metabolism was more efficient than the one of parental cells in all culture conditions tested. However, a similar cell specific oxygen uptake rate measured for the two clones suggests that the PYC enzyme effect may be mostly limited to the cytosol.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS .....	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT .....	VII
TABLE DES MATIÈRES .....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XIV
LISTE DES ANNEXES.....	XVII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1    REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	4
1.1    Les cellules mammifères.....	4
1.1.1    Les conditions de cultures.....	5
1.1.2    Les milieux de culture .....	6
1.1.3    Le métabolisme des cellules animales .....	7
1.1.4    Le lactate comme nutriment.....	10
1.2    L'optimisation des cultures en mode batch.....	10
1.2.1    La variation des conditions de culture.....	11
1.2.2    L'optimisation du milieu de culture .....	14
1.2.3    Substitution des sources de carbone.....	15
1.3    Le génie métabolique dans le métabolisme primaire .....	16
1.3.2    Remplacement des substrats assisté par l'ingénierie métabolique.....	21
1.3.3    Le retrait sélectif des déchets métabolique en cours de culture .....	21

1.4	Les stratégies de culture en mode fed-batch .....	22
1.4.1	Le contrôle des nutriments à bas niveau .....	22
1.4.2	Le design des solutions d'alimentation .....	24
1.5	Le suivi et le contrôle des cultures en mode fed-batch .....	25
1.5.1	Les paramètres en ligne .....	26
1.5.2	Le contrôle des cultures par des méthodes de suivi indirect .....	30
1.5.3	Le contrôle des cultures par mesure directe .....	32
1.5.4	Protocole d'alimentation défini <i>a priori</i> .....	33
1.5.5	Le contrôle aidé par des modèles .....	34
CHAPITRE 2	RECHERCHE D'UNE SOLUTION D'ALIMENTATION .....	37
2.1	Protocole.....	37
2.2	Ajout de nutriments non limitants .....	38
2.3	Ajout d'un seul nutriment limitant .....	39
2.4	Ajout simultané de glucose et glutamine .....	41
2.5	La composition de la solution d'alimentation .....	42
CHAPITRE 3	EXPLOITING THE METABOLISM OF PYC EXPRESSING HEK293 CELLS IN FED-BATCH CULTURES.....	44
3.1	Présentation de l'article .....	44
3.2	Auteurs .....	44
3.3	Abstract .....	45
3.4	Introduction .....	45
3.5	Materials and Methods .....	48
3.5.1	Cell lines.....	48
3.5.2	Culture medium and feeding solution .....	48
3.5.3	Batch and fed-batch cell cultivation in shake flasks .....	48

3.5.4	Bioreactor cell cultivation .....	49
3.5.5	Feeding strategy for bioreactor .....	49
3.5.6	Analytical techniques .....	50
3.5.7	Oxygen uptake rate.....	51
3.6	Results .....	52
3.6.1	Batch experiments in shake flasks .....	52
3.6.2	Fed-batch experiments in shake flask .....	53
3.6.3	Batch experiments in bioreactors .....	54
3.6.4	Fed-batch experiments in bioreactors .....	56
3.6.5	Oxygen uptake rate.....	58
3.7	Discussion .....	59
3.8	Conclusions .....	62
	Acknowledgements .....	62
	References .....	63
	DISCUSSION GÉNÉRALE .....	67
	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....	71
	BIBLIOGRAPHIE .....	74
	ANNEXES .....	82

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 - Comparaison des effets d'une culture hypothermique selon différentes études.....	13
Tableau 1.2 - Comparaison des effets de la pyruvate carboxylase .....	20
Tableau 2.1 - Comparaison entre les différentes solutions d'alimentation contenant une seule source de carbone .....	40
Table 3.1 - Impact of recombinant PYC2 expression on metabolic rates in shake flasks .....	54
Table 3.2 - Impact of recombinant PYC2 expression on metabolic rates in bioreactors .....	56

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 - Métabolisme énergétique simplifié .....	8
Figure 1.2 - Schéma réactionnel proposé par (Irani, Wirth et al. 1999) pour expliquer l'effet de PYC2. La figure de gauche présente le métabolisme normal, la figure droite illustre le métabolisme lors de la surexpression de la PYC2. ....	17
Figure 1.3 - Schéma général d'un système de mesure <i>ex situ</i> .....	28
Figure 1.4 - Schéma général d'un contrôle OLFO .....	35
Figure 2.1 - Profil de croissance en fonction des différents cocktails de nutriments ajoutés .....	38
Figure 2.2- Profil de croissance en fonction des différentes alimentations en maintenant le glucose et la glutamine à des niveaux non limitants .....	41
Figure 2.3 - Détermination du rapport stœchiométrique entre le glucose et la glutamine .....	43
Figure 3.1 - Design of the automated feeding strategy .....	51
Figure 3.2 - Viable cell (A), glucose (B), glutamine (C) and lactate (D) concentrations profiles during batch and fed-batch cultivation of 293-D9 and 293-F5 cells in shake flasks .....	53
Figure 3.3 - Viable cell (A), glucose (B), glutamine (C), lactate (D), ammonia (E) and interferon (F) concentrations profiles during batch and fed-batch cultivation of 293-D9 and 293-F5 cells in bioreactors .....	56
Figure 3.4 - Comparison of maximum interferon titer between 293-D9 and 293-F5 cells during batch and fed-batch cultivation in bioreactors and shake flasks .....	58
Figure 3.5 - Comparison of specific oxygen consumption rate between 293-D9 and 293-F5 cells during batch and fed-batch cultivation in bioreactors .....	59

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

$\mu$	Taux de croissance
293-D9	Lignée parentale de HEK293 utilisée dans ce projet
293-F5	Lignée de HEK293 exprimant la pyruvate carboxylase utilisée dans ce projet
Ac-CoA	Acétylcoenzyme A
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
Cit	Citrate
DMFe <sup>+</sup>	1,1'-dimethylferricinium
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	Érythropoïétine
FADH <sub>2</sub>	Flavine adénine dinucléotide
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	<i>Flow injection analysis</i>
Glc	Glucose
Gln	Glutamine

GS	Glutamine synthétase
GUR	<i>Glucose uptake rate</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IFN	Interféron
IVC	<i>Integral of viable cells</i>
IVCC	<i>Integral of viable cells concentration</i>
Lac	Lactate
LDH	Lactate déshydrogénase
Mal	Malate
MFA	<i>Metabolic flux analysis</i>
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NS0	Lignée cellulaire de myélome de souris
OAA	Acide oxaloacétique
OLFO	<i>Open-loop-feedback-optimal</i>
PC	Pyruvate carboxylase (mitochondriale)
PER.C6	Lignée cellulaire humaine
PID	Proportionnel intégral dérivé
PYC, PYC2	Pyruvate carboxylase (cytosolique)



Pyr	Pyruvate
q	Taux spécifique de consommation/production
SEAP	<i>Secreted Alkaline Phosphatase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Suc	Succinate
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
YSI 2700	<i>Yellow Spring Instrument</i>
$\alpha$ KG	Alpha-ketoglutarate

## **LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE 1 – Profil de croissance en fonction des différentes alimentations en maintenant le glucose ou la glutamine à des niveaux non limitants .....	82
--	----

## INTRODUCTION

Le vieillissement des populations dans le monde occidental et la croissance de la consommation de médicaments dans les pays en voie de développement augmentent considérablement la demande mondiale pour les produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques. Le marché des produits biopharmaceutiques est l'un des secteurs les plus en croissance (Dietmair, Nielsen et al. 2011). Les coûts associés au développement et à la production de ces produits sont substantiels et augmentent leur prix de vente. Pour réduire le fardeau financier que représentent ces dépenses pour le système de santé et les compagnies d'assurance, il est nécessaire d'optimiser les procédés biologiques impliqués dans toutes les phases de développement cliniques et de production industrielle. Deux principaux objectifs sont visés lors du développement de bioprocédés. D'abord, il faut minimiser le temps et les coûts nécessaires pour obtenir le produit désiré en quantité suffisante pour les essais cliniques. Puis, être capable de fournir suffisamment de matériel pour répondre à la demande à un coût de vente raisonnable (Birch and Racher 2006).

La majorité des biomolécules actuellement sur le marché sont produites par la culture de cellules mammifères (Butler 2005), car dans bien des cas cette plateforme d'expression demeure la seule permettant d'obtenir un produit correctement replié et glycosylé. Or, lorsque utilisée en mode cuvée (batch), cette plateforme de production est caractérisée par de faibles concentrations finales en produit et de hauts coûts de production liés notamment au milieu de culture utilisés. Le mode cuvée-alimentée (fed-batch) permet habituellement de prolonger le temps de culture et d'augmenter la concentration cellulaire ce qui mène à des concentrations plus élevées du produit désiré. L'augmentation des rendements permet ainsi de réduire les coûts de production. Du même coup, les processus de purification en aval s'en trouvent souvent simplifiés.

La principale problématique liée au mode fed-batch est l'accumulation de déchets métaboliques dans les milieux de culture, déchets qui sont susceptibles d'inhiber la croissance cellulaire et la production. Il existe une panoplie d'approches pour tenter de remédier à ces effets néfastes (voir chapitre 1). L'une d'entre elles est l'ingénierie métabolique. Cette méthode consiste à manipuler le phénotype des cellules productrices afin d'induire un effet jugé désirable.

Les cellules d'embryons humains (HEK293) sont une plateforme d'expression très avantageuse pour la production de protéines recombinantes. Leur origine humaine permet

d'obtenir une glycosylation très similaire à celle retrouvée chez l'homme, ce qui augmente l'activité biologique de ces molécules et donc l'efficacité des traitements. Les protéines ainsi produites peuvent aussi réduire les réactions immunologiques des patients puisqu'elles ne contiennent pas de motifs de glycosylation non humains (Durocher and Butler 2009).

Dans cette optique, des cellules HEK293 déjà transfectées pour exprimer de façon stable de l'interféron- $\alpha 2\beta$  ont été modifiées par l'insertion d'un gène de levure codant pour la pyruvate carboxylase cytosolique (PYC) (Henry and Durocher 2011). Il en est résulté une lignée cellulaire présentant un métabolisme hautement efficace, c'est-à-dire produisant très peu de déchets métaboliques. Cependant, le phénotype avantageux de ces cellules n'a jusqu'à maintenant jamais été exploité pour une culture en mode fed-batch, ni dans des conditions semblables à celles retrouvés à l'échelle industrielle.

### Objectifs

S'inscrivant dans le contexte décrit précédemment, l'objectif général de ce mémoire était de concevoir et d'implanter une stratégie d'alimentation permettant de maximiser la croissance en mode cuvée-alimentée pour une culture de cellules HEK293 surexprimant la pyruvate carboxylase. Pour atteindre cet objectif, les objectifs spécifiques suivants doivent être satisfaits.

- Caractériser les lignées HEK293 parentale et modifiée en mode cuvée dans des cultures en flacons agités (taux de croissance, taux de production et de consommation des métabolites extracellulaires).
- Élaborer une stratégie d'alimentation et concevoir une solution d'ajout qui maximise la croissance cellulaire à petite échelle.
- Mettre en place une boucle de contrôle permettant d'appliquer cette stratégie de façon automatisée.
- Valider la stratégie développée en la transposant dans un environnement contrôlé, soit la culture en bioréacteur de 2 L

### Organisation du mémoire

Le premier chapitre constitue une revue de la littérature portant sur les approches utilisées pour la culture cellulaire en modes cuvée et cuvée-alimentée, afin de souligner les grandes problématiques de la culture en bioréacteur. Dans le second chapitre, les efforts d'optimisation de

la solution d'alimentation sont présentés. Le chapitre suivant présente un article scientifique soumis pour publication dans la revue *Journal of Biotechnology* et explique le travail effectué pour optimiser la croissance cellulaire en effectuant le changement d'échelle. Enfin, le dernier chapitre se veut une conclusion et des recommandations pour des travaux futurs y sont formulées.

## CHAPITRE 1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1 Les cellules mammifères

Le secteur des protéines recombinantes est en pleine expansion et représente une part importante du marché des produits biologiques (Dietmair, Nielsen et al. 2011). Ces protéines sont relativement complexes et nécessitent un degré de glycosylation élevé pour être actives. Les plateformes de production plus simples telles que les bactéries ou les levures qui présentent de hauts rendements de production dus à une croissance rapide et à une densité finale élevée permettent d'obtenir des produits biologiques à moindre coût. Par contre, ces micro-organismes ne sont généralement pas en mesure de produire des protéines correctement repliées et glycosylées. Ainsi, la production de plusieurs protéines biothérapeutiques requiert des micro-organismes évolués capables de transformations post-traductionnelles : les cellules mammifères. Les cellules animales sont complexes et nécessitent des milieux de culture très complets et onéreux pour croître. De plus, leur productivité et la concentration finale en produit sont faibles ce qui de surcroît complique la purification en aval.

Plusieurs lignées mammifères ont été adaptées pour la production de protéines recombinantes et d'anticorps, chacune possède des caractéristiques différentes et avantageuses selon l'application. Le choix de la lignée cellulaire dépend de nombreux facteurs. La capacité à produire de hautes concentrations de produit, de qualité uniforme et en un temps restreint demeure le plus souvent les critères dominants (Birch and Racher 2006). D'autres facteurs peuvent aussi influencer, tels que la qualité et le type de transformations post-traductionnelles des cellules et le type d'expression désirée (stable ou transitoire). La nature du milieu de culture dans lequel les cellules croissent peut aussi faire pencher la balance, notamment à cause de l'incidence sur les coûts de production et de purification. Les plateformes cellulaires proviennent des mammifères souvent utilisés en tests cliniques tels que les hamsters (CHO, BHK), les souris (NS0) et les humains (PER.C6, HEK) (Seth, Hossler et al. 2006).

Les cellules les plus utilisées en industrie proviennent de hamsters (Li, Vijayasankaran et al. 2010), les *Chinese Hamster Ovary* (CHO), principalement parce qu'elles sont très bien caractérisées et qu'il existe déjà plusieurs protéines recombinantes produites par le biais de cette plateforme qui ont été homologuées par la FDA (Durocher and Butler 2009). Par contre, leur

origine animale peut mener à des formes de glycosylation différentes de celles retrouvée chez l'humain et possiblement moins actives. Les cellules humaines *Human Embryo Kidney* (HEK) sont quant à elles très utilisées pour l'expression d'agents médicaux de façon transitoire ou stable et pour la production de vecteurs viraux (Loignon, Perret et al. 2008; Swiech, Kamen et al. 2011). Elles sont facilement transfectables et présentent la plupart du temps une bonne productivité spécifique. L'origine de ces cellules permet aussi d'espérer une forme de protéine très proche de celle retrouvée chez l'homme (Durocher and Butler 2009). Cette similarité augmente toutefois les risques de contamination par des organismes pathogènes pour les patients et requiert donc encore plus de précautions quant à la stérilité des procédés en place.

### **1.1.1 Les conditions de cultures**

Une lignée cellulaire continue est établie à partir de cellules d'un organisme hôte, ces cellules sont d'abord cultivées dans des milieux de culture contenant du sérum. Périodiquement, une partie des cellules est transférée dans du milieu frais afin de maintenir des conditions favorables à la survie. Enfin, par clonage, on obtient une population uniforme de cellules qui expriment un seul phénotype. Les cellules ainsi obtenues peuvent seulement se diviser un nombre de fois restreint (sénescence). C'est pourquoi elles sont ensuite immortalisées, souvent à l'aide de transfection d'ADN d'adénovirus (Graham and Van Der Eb 1973; Graham, Smiley et al. 1977). Par la suite, elles sont capables de se répliquer sans arrêt et leur durée de vie est ainsi théoriquement infinie. Cette dernière étape induit de profonds changements métaboliques dans les cellules et elles perdent une partie des caractéristiques des cellules hôtes (Shaw, Morse et al. 2002). Enfin, les cellules jusqu'alors adhérentes sont progressivement adaptées pour la culture en suspension dans du milieu sans sérum. Ces adaptations sont nécessaires pour que la plateforme de culture soit utilisable à l'échelle industrielle où la cuve agitée demeure le mode de culture prédominant (Seth, Hossler et al. 2006). Les conditions de cultures doivent être similaires à celles retrouvées dans l'organisme hôte. La température doit être maintenue à 37 °C comme dans tous les mammifères. Le pH est généralement contrôlé à l'aide d'un tampon CO<sub>2</sub>-bicarbonate autour de celui physiologique de 7. La concentration en ions (osmolarité) durant la culture ne doit pas trop augmenter, typiquement elle doit être stable autour de 260-320 mOsm/L. Une quantité d'oxygène doit aussi être disponible aux cellules pour permettre la respiration, généralement entre 30-40 % de la saturation en oxygène dissous est suffisant, bien que ce ne soit pas toujours

optimal (Jan, Petch et al. 1997). Afin que le milieu soit uniforme et que les transferts gazeux aient lieu efficacement, l'agitation du volume de culture est nécessaire. Or, les cellules mammifères en suspension sont fragiles et peuvent être facilement cisailées par les hélices, il faut donc limiter les vitesses d'agitation et la quantité d'énergie transmise au bioréacteur (Shuler and Kargı 1992). Dans le même ordre d'idée, l'aération des bioréacteurs se fait, lorsque possible, par aération de surface afin d'éviter la formation de bulle et de mousse, sinon elle est faite à l'aide d'un distributeur de gaz permettant de former des bulles très petites.

### **1.1.2 Les milieux de culture**

Les milieux de culture actuels pour les cellules animales sont très complexes et tentent d'alimenter le métabolisme cellulaire de façon à maximiser la croissance et la production des cellules, tout en étant capables de maintenir la reproductibilité des résultats de lot en lot. La plupart des milieux de culture contiennent de 50 à 70 composants chimiques différents, incluant des sources de carbone (glucose), des acides aminés essentiels et non essentiels, des vitamines, des sels, des lipides et des éléments trace (Pacis, Vijayasankaran et al. 2010). Il existe deux types de milieu de culture; ceux chimiquement définis et les milieux dits "complexes" pour lesquels la composition exacte n'est pas connue, par exemple s'ils contiennent du sérum. Le sérum est un produit d'origine animale la plupart du temps d'origine bovine. Il contient plusieurs facteurs de croissance, hormones et protéines qui permettent la plupart du temps une excellente croissance cellulaire. Par contre, le sérum, comme tout composant de provenance animale, peut être une source importante de contaminant et de virus (Merten 2002) en plus d'avoir une composition pouvant varier de façon significative d'un lot à l'autre. C'est pourquoi l'industrie se tourne maintenant vers les milieux chimiquement définis et évite le sérum, lorsque c'est possible (Li, Vijayasankaran et al. 2010). Dans ce type de milieu chaque élément est défini et toujours de même concentration, ce qui réduit considérablement la variation entre les différents lots. La composition exacte des milieux commerciaux est généralement gardée secrète et ceux-ci sont souvent optimisés pour un type cellulaire et/ou une application donnée. Par contre, certaines lignées ne pourront atteindre des taux de croissance élevés en milieu chimiquement défini et nécessiteront l'ajout d'hydrolysats pour obtenir les mêmes bénéfices que le sérum (Pacis, Vijayasankaran et al. 2010). Les hydrolysats proviennent de la digestion des protéines et leur composition peut également varier sensiblement d'un lot à l'autre. Ils peuvent être une source



d'inconsistance et de variabilité du milieu et ce problème reste donc entier dans certains cas. Quelques ajouts sont aussi nécessaires pour aider la production à l'échelle industrielle. Afin de réduire les agrégats de cellules, le niveau de calcium dans le milieu est réduit et des agents anti-agrégats peuvent aussi être ajoutés. Lorsque des risques de contamination élevés sont présents, des antibiotiques sont introduits. Finalement, lorsque la formation de mousse est problématique des tensio-actifs, comme le Pluronic, sont ajoutés. Ces derniers protègent également contre le cisaillement induit par l'agitation et/ou le bullage.

### **1.1.3 Le métabolisme des cellules animales**

Le métabolisme des cellules animales comprend des milliers de réactions (Seth, Hossler et al. 2006). C'est pourquoi dans cette section seulement le métabolisme énergétique central est présenté. Cet enchainement de réactions est responsable de la production d'énergie à l'intérieur de la cellule, celle-ci est stockée sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La formation de protéines recombinantes nécessite une quantité d'énergie importante et il est probable qu'une réserve d'ATP supérieure permette d'augmenter la productivité des cellules (Pendse and Bailey 1994).

Le métabolisme énergétique est formé de deux voies principales : la voie oxydative et la voie de production de lactate (glycolyse) (Figure 1.1). Ces deux voies commencent de la même façon avec la conversion du glucose en pyruvate pour un rendement net de 2 ATP et 2 pyruvate par molécule de glucose, suivant une chaîne de 10 réactions. Ensuite, le pyruvate peut être transformé par la lactate déshydrogénase en lactate dans la glycolyse pour produire 1 mol de lactate et 1 mol d'ATP par pyruvate. Dans la voie oxydative, le pyruvate est transporté dans la mitochondrie, où il perd un carbone sous forme de  $\text{CO}_2$ , devient acetyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase et est ensuite transformé en eau et en dioxyde de carbone. Les molécules formées par la dégradation du pyruvate ( $\text{NADH}$  et  $\text{FADH}_2$ ) réagissent ensuite avec l'oxygène dans la chaîne de phosphorylation oxydative pour former un total net de 36 mol d'ATP/mol Glc (Horton 1993). La glutamine constitue généralement une autre source importante de carbone et d'énergie pour les cellules et c'est par conséquent l'acide aminé présent en plus grande concentration dans les milieux de culture (entre 2-5 mM). La glutamine peut s'oxyder complètement en  $\text{CO}_2$  ou subir une oxydation partielle pour être ultimement transformée en lactate, alanine ou aspartate. L'ensemble de ces réactions est appelé la glutaminolyse et est parfois responsable de la majeure

partie de l'apport énergétique des cellules (Petch and Butler 1994). Lorsqu'oxydée complètement, la glutamine peut former jusqu'à 27 ATP/mol Gln alors que les autres voies ont un rendement de 9 ATP/mol Gln (Schneider, Marison et al. 1996). La principale source d'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) ou d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) est la conversion de la glutamine en glutamate et ensuite son entrée dans le cycle de Krebs sous forme de  $\alpha$ -ketoglutarate, car chaque réaction libère une molécule d'ammoniac. La glutamine peut aussi se dégrader spontanément en  $\text{NH}_4^+$  (Ozturk and Palsson 1990). Comme mentionné précédemment, le métabolisme des lignées cellulaires immortalisées est passablement dérégulé par le processus d'immortalisation. Il se retrouve souvent plus proche des cellules cancéreuses que de celui des cellules hôtes (Irani, Wirth et al. 1999).

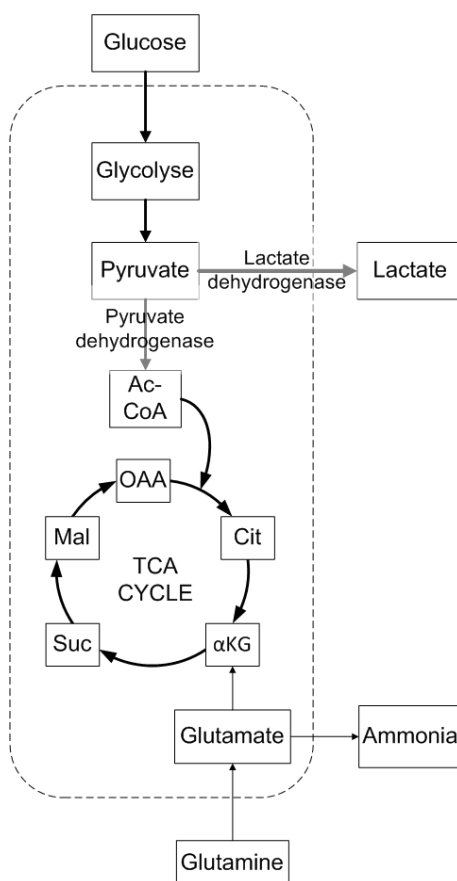


Figure 1.1 - Métabolisme énergétique simplifié

### 1.1.3.1 L'utilisation des nutriments

L'utilisation du glucose par les lignées immortalisées est très inefficace, en effet, il a été depuis longtemps démontré que les cellules sont incapables d'oxyder la totalité du glucose en

CO<sub>2</sub> et en eau par la voie oxydative. En fait, dans le cas des cellules hybridomes, jusqu'à 96 % du glucose utilisé est transformé en lactate par la glycolyse (Fitzpatrick, Jenkins et al. 1993; Petch and Butler 1994). Des analyses de flux métabolique par des traceurs isotopiques dans les cellules HEK293 et CHO suggèrent plutôt des flux pyr-lac autour de 75 % (Ahn and Antoniewicz 2011; Henry and Durocher 2011; Henry, Jolicoeur et al. 2011; Ahn and Antoniewicz 2013). Il n'en demeure pas moins que dans tous ces cas l'utilisation du cycle TCA demeure faible par rapport à la glycolyse. Or, la glycolyse ne produit que peu d'énergie et un métabolite nocif : le lactate. Pour pallier ce manque d'énergie, la glutamine joue un rôle prépondérant dans le métabolisme primaire, elle peut même parfois s'avérer la principale source d'ATP (Reitzer, Wice et al. 1979; Lanks 1986). Cependant, la glutaminolyse produit une grande quantité d'ammoniac tel qu'évoqué précédemment et peut aussi contribuer à la formation du lactate dans plusieurs lignées cellulaires transformée. En effet, 9% de la glutamine est transformée en lactate dans des hybridomes murine (Petch and Butler 1994), 13% dans des cellules diploïdes (Zielke, Sumbilla et al. 1980) et jusqu'à 60% dans des cellules glioblastomes (DeBerardinis, Mancuso et al. 2007). Dans des cellules HEK293, la glutamine ne contribue pas significativement à la formation de lactate (Henry, Jolicoeur et al. 2011).

### **1.1.3.2 Les métabolites secondaires**

Le lactate produit en grande quantité par le métabolisme déficient des cellules immortalisées a indirectement un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire. En effet, ce sont l'acidification du milieu et l'augmentation de l'osmolarité accentuée par l'ajout de base qui mènent à la mortalité cellulaire, selon que le pH de la culture est contrôlé ou non. Si l'on soustrait l'effet négatif de l'osmolarité, le lactate n'est inhibiteur qu'à des concentrations très élevées dans les BHK, les CHO et les hybridomes soit autour de 60mM dans tous ces cas (Ozturk, Riley et al. 1992; Lao and Toth 1997; Cruz, Freitas et al. 2000).

L'ammoniac atteint un niveau toxique à des concentrations largement inférieures à celles du lactate, la plupart du temps des effets sur la croissance sont visibles à des niveaux variant entre 1 et 5mM (Schneider, Marison et al. 1996; Yang and Butler 2000). Deux mécanismes semblent agir simultanément pour expliquer cette toxicité. La diminution du pH intracellulaire perturbe les gradients électrochimiques de la cellule et l'ammoniac déplace l'équilibre des réactions enzymatiques (Schneider, Marison et al. 1996; Cruz, Freitas et al. 2000). Par contre, les

effets nocifs sont bien connus. L'ion ammonium a un effet inhibiteur sur la croissance, induit l'apoptose des cellules et affecte la qualité des protéines recombinantes en altérant le patron de glycosylation de ces dernières (Schneider, Marison et al. 1996; Gawlitzek, Valley et al. 1998; Yang and Butler 2000).

L'accumulation du lactate et de l'ammoniac demeure très souvent le frein principal à la croissance cellulaire et à l'obtention de concentrations élevées en produit. C'est pourquoi plusieurs approches ont été tentées, avec plus ou moins de succès, afin de réduire la production de ces métabolites ou de les éliminer de l'environnement de culture. Elles sont présentées dans les prochaines sections.

### **1.1.4 Le lactate comme nutriment**

En cours de culture, souvent lorsque le glucose est totalement consommé, la consommation de lactate est observée dans le cas de plusieurs lignées cellulaires. (Martinez, Dietmair et al. 2013). Cette consommation en fin de culture ne permet cependant pas de maintenir la phase exponentielle de croissance. Par contre, les cellules qui présentent un tel métabolisme sont susceptibles de maintenir une bonne viabilité plus longtemps, puisqu'elles éliminent un métabolite néfaste (Mulukutla, Gramer et al. 2012). Les causes d'un tel changement métabolique demeurent nébuleuses puisqu'il est parfois observé même quand le glucose et les acides aminés sont encore à des niveaux non limitants. Luo (Luo, Vijayasankaran et al. 2012) a découvert que l'ajout de cuivre dans le milieu pouvait induire ce changement dans certaines cellules CHO. La compréhension de ce phénomène permettrait peut être d'induire une phase de consommation de lactate plus tôt durant la culture permettant ainsi d'éliminer au moins une partie du problème des déchets métaboliques.

## **1.2 L'optimisation des cultures en mode batch**

Le mode cuvée (batch) est très utilisé pour des fins de recherche et développement afin d'optimiser les conditions de culture pour améliorer la production de produit. L'avantage de ce mode de culture est sa grande simplicité. En effet, il s'agit d'inoculer les cellules dans le milieu de culture et d'observer leur comportement jusqu'au déclin de la viabilité. La croissance cellulaire dans ce cas-ci peut être limitée soit par l'accumulation de déchets métaboliques principalement le lactate et l'ammoniac, ou bien par l'épuisement d'un ou plusieurs nutriments

clés dans le milieu de culture. Pour palier l'épuisement des nutriments le mode fed-batch peut être utilisé et sera discuté dans la prochaine section. Le travail d'optimisation en mode batch se fait donc dans la réduction de l'accumulation des métabolites secondaires néfastes. Principalement trois aspects sont optimisés dans ce mode et seront traités ici : les conditions de cultures, les composants du milieu de culture et les cellules.

## **1.2.1 La variation des conditions de culture**

Les conditions physiologiques sont souvent celles utilisées pour la culture cellulaire. Pourtant, au fil du temps, il devient de plus en plus évident que ces paramètres ne sont pas toujours optimaux pour maximiser la production de protéines recombinantes. Dans cette section, les approches visant à augmenter la concentration finale de produits en modifiant les paramètres de culture seront étudiées.

### **1.2.1.1 La variation de la température**

Pour favoriser la croissance cellulaire, la température des cultures cellulaires est généralement maintenue à celle du corps. Une température plus élevée induit généralement l'apoptose et la fin de la culture. Par contre, des conditions légèrement hypothermiques peuvent être bénéfiques pour la production de protéines recombinantes. Le Tableau 1.1.1 résume quelques études récentes utilisant cette stratégie. On peut y voir facilement que cette stratégie est souvent efficace dans les cellules CHO, mais n'est pas toujours un succès pour les autres lignées. Dans les cellules hybridomes par exemple, le taux de productivité spécifique est demeuré inchangé selon la température alors que la croissance a diminué, ce qui n'a pas mené à une plus grande production de produit (Bloemkolk, Gray et al. 1992). Un point commun de toutes les études sur le sujet est le ralentissement du métabolisme en conditions hypothermiques. Le taux de croissance diminue conjointement avec la consommation de glucose/glutamine et la production de lactate/ammoniac, ce qui aide à maintenir la viabilité cellulaire. Cette stratégie demeure extrêmement facile à implanter puisqu'elle ne requiert aucun équipement supplémentaire. Une culture en 2 phases est souvent plus souhaitable que les cultures entièrement hypothermiques présentées dans le Tableau 1.1. D'abord, la phase de croissance à 37°C permet de produire une grande quantité de biomasse rapidement. Puis, la phase de production à une température réduite aide à prolonger la viabilité des cellules en les maintenant dans la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire qui

semble associé à une productivité spécifique plus élevée (Li, Vijayasankaran et al. 2010). Les cultures réalisées de cette façon tirent ainsi avantage des deux états métaboliques des cellules.

### **1.2.1.2 La variation du pH**

Le pH joue un rôle critique pour le métabolisme des cellules. Les scientifiques qui ont étudié l'effet de la température sur les lignées cellulaires se sont aussi penchés sur la détermination d'un pH optimal. Ce dernier se situe souvent autour de 7. Pour les cellules humaines F2N78, le pH optimal pour la production était de 6,8 lorsque cultivées à 37°C. Le taux de croissance ainsi que la productivité spécifique étaient plus bas à ce pH. Par contre, la culture a duré plus longtemps ce qui a augmenté la concentration finale de produit. L'effet de la réduction du pH est donc semblable à celui observé par la réduction de température. Toutefois, le rapport ammoniac/glutamine s'en trouve presque doublé en diminuant le pH de 7,4 à 6,8. Néanmoins, la production globale était significativement meilleure à 37°C et à un pH de 6,8 comparativement aux autres conditions testées (Seo, Kim et al. 2013). Pour deux clones de CHO (Kim and Lee 2007), la consommation de nutriments diminuait en même temps que la production de métabolite secondaire lorsque le pH diminuait. C'est aussi le cas pour les autres études sur les CHO (Yoon, Choi et al. 2005; Trummer, Fauland et al. 2006). Pour le taux de croissance, il y avait clairement un optimum selon les clones, le pH et la température. Ainsi, le pH optimal pour la croissance à 37°C diffère de celui en condition hypothermique et il n'est pas le même entre les clones non plus. Cette disparité entre le pH optimal selon la température est aussi observée pour d'autres lignées CHO (Yoon, Choi et al. 2005; Trummer, Fauland et al. 2006). Finalement, pour ce qui est de l'expression des produits dans les CHO, elle est généralement plus élevée au pH optimal, mais l'amélioration de la production n'est jamais aussi significative que lorsque la température est diminuée. L'optimisation du pH est donc variable entre les clones d'une même lignée et varie selon les conditions de culture. Les gains potentiels d'un tel travail demeurent toutefois assez limités. Il est donc préférable de se consacrer à l'optimisation d'autres paramètres de culture avant celui-ci.

Tableau 1.1 - Comparaison des effets d'une culture hypothermique selon différentes études

<i>Lignée cellulaire</i>	<i>Température hypothermique (°C)</i>	<i>Effets sur la croissance (<math>\mu</math>)</i>	<i>Effets sur le temps de culture</i>	<i>Effets sur la productivité spécifique</i>	<i>Effets sur la production finale</i>	<i>Ref.</i>
<b>Humaine F2N78</b>	33	0,75	+2-3 jours	0,6	0,33	(Seo, Kim et al. 2013)
<b>CHO clone A</b>	33	Diminuée	Augmente	Inchangé	Semblable	(Kim and Lee 2007)
<b>CHO clone B</b>		Diminuée	Augmente	Augmente	2,5	
<b>CHO</b>	30	Arrêtée	+5 jours	1,7	Diminuée	(Trummer, Fauland et al. 2006)
	33	Diminuée	+3 jours	1,4	Augmentée	
	35	Semblable	+1 jour	1	Augmentée	
<b>CHO</b>	32,5	0,33	+5-6 jours	1,5	2,7	(Yoon, Choi et al. 2005)

### 1.2.2 L'optimisation du milieu de culture

La culture en mode batch est limitée par la quantité de nutriments disponibles; l'optimisation de celle-ci repose donc sur l'introduction dans le milieu de composants qui pourraient favoriser la croissance cellulaire et la production du produit d'intérêt. Encore aujourd'hui, il est difficile de trouver des substituts pour pallier les facteurs de croissance et autre élément non défini du sérum. Les cellules nécessitent une panoplie de composés différents pour atteindre une croissance optimale. Différents clones d'une même lignée n'ont pas les mêmes demandes nutritionnelles. L'optimisation du milieu demeure donc fastidieuse (Butler 2005). En plus, il faut être en mesure de trouver un équilibre entre les composants afin de minimiser la production de déchets métaboliques. Il est possible de développer le milieu en ajoutant un composé à la fois et en vérifiant son effet (Stoll, Mühlethaler et al. 1996). Par contre, cette méthode est extrêmement longue en plus de négliger les interactions entre les nutriments. L'analyse des flux métaboliques (MFA) peut s'avérer un outil important pour le design de milieux de culture. En effet, cet outil permet de connaître les demandes métaboliques en régime permanent pendant la culture et ainsi la quantité des composants à ajouter dans le milieu. Bien que cela constitue un bon point de départ, la MFA est limitée par les méthodes de mesure actuelles. De plus, certains composants promoteurs de la croissance sont difficiles à inclure dans ce type d'études. L'application des méthodes des plans d'expériences (*Design of Experiments*) peut alors être utilisée. Cette approche a notamment été appliquée dans le cas des cellules GS-CHO (Zhang, Wang et al. 2013). Il faut d'abord choisir les suppléments qui pourraient avoir un impact sur les cellules. Ensuite, à l'aide de la méthode de Plackett–Burman et d'une série d'expériences, les composants qui ont un impact positif sur la croissance et/ou la productivité sont conservés pour les étapes subséquentes. Puis, une autre série de conditions est testée à l'aide d'un plan composite avec points centraux (*central composite design*) ce qui permet de déterminer les concentrations optimales des suppléments. Le milieu ainsi obtenu a augmenté la production spécifique des cellules et la concentration finale en produit était 18 % plus élevée que dans le milieu commercial. Une approche similaire a été appliquée pour diverses lignées cellulaires (Kim, Lee et al. 2006; Huang, Marquis et al. 2007; Dong, Mandenius et al. 2008). Même si l'approche permet d'optimiser le nombre d'expériences requises, ce dernier demeure néanmoins élevé pour obtenir un résultat significatif.



### 1.2.3 Substitution des sources de carbone

Le métabolisme des lignées cellulaires immortalisées est caractérisé par une consommation rapide du glucose et de la glutamine, entraînant cependant l'accumulation de déchets métaboliques. Pour améliorer l'efficacité d'utilisation des nutriments, il est possible de remplacer ces composants traditionnels par d'autres sources de carbone. Ainsi, pour réduire la production de lactate, le glucose peut être substitué par un autre hexose (mannose, fructose ou galactose). Pour diminuer la production d'ammoniac, le glutamate est le plus souvent utilisé, car il possède un groupement amine de moins. Pour des cellules adhérentes, le pyruvate s'est également avéré être un substitut efficace (Genzel, Ritter et al. 2005). Le remplacement du glucose par du fructose, du galactose et du mannose a été étudié dans des cellules CHO (Altamirano, Paredes et al. 2000). Le glucose et le mannose ont permis aux cellules d'atteindre une concentration finale de  $1,2 \times 10^6$  cell/ml alors qu'elle était plus basse avec le galactose ( $0,8 \times 10^6$  cell/ml) et avec le fructose ( $0,5 \times 10^6$  cell/ml). Comme la concentration finale en produit était directement proportionnelle à la quantité de biomasse, l'amélioration de la production a suivi la même tendance que celle de la croissance. La culture contenant du mannose était presque identique au contrôle (glucose) avec une croissance similaire, une consommation rapide du sucre et des productions élevées de lactate et d'ammoniac. Par contre, pour le galactose et le fructose, la croissance a ralenti et la production de lactate était presque nulle. Cependant, la production d'ammoniac a augmenté, probablement parce que la glutamine était transformée en pyruvate pour compenser et alimenter le cycle TCA en carbone. Ensuite, l'effet combiné d'une double substitution glutamate/galactose a montré qu'il était possible de réduire les productions d'ammoniac et de lactate simultanément, à condition que les cellules expriment la glutamine synthétase (GS). Par contre, avec milieu glucose/glutamate une plus grande production a été atteinte, étant donné le faible taux de croissance observé dans le milieu contenant du galactose. En mode fed-batch, la substitution graduelle du glucose par une solution d'alimentation contenant du galactose a mené à une consommation du lactate en absence de glucose et une augmentation marquée de la concentration maximale de cellules. Toutefois, pour la durée de la culture, cela ne s'est pas traduit par une augmentation de la production de t-PA, le produit d'intérêt (Altamirano, Paredes et al. 2004). La co-consommation du lactate et du galactose a mené à une concentration de biomasse presque 2 fois plus grande (Altamirano, Illanes et al. 2006). Hong *et al.* (Hong, Cho et al. 2010) ont démontré que la substitution de la glutamine par le

glutamate dans des CHO augmentait la production spécifique des cellules de 1,7 fois, en plus d'augmenter le degré de glycosylation (galactosylation) de l'anticorps et d'augmenter son activité. Cet effet est probablement causé par la réduction de l'ammoniac, menant à un pH intracellulaire plus favorable à la production. Par contre, encore une fois, la croissance était plus lente. Enfin, une augmentation de 30% de la production totale a été observée dans des cellules CHO cultivées dans un réacteur continu avec 10mM de mannose comme source de carbone. Le taux de consommation de sucre et celui de production de lactate ont aussi diminué. De plus, une plus haute concentration cellulaire a été atteinte dans ces conditions par rapport au contrôle (Berrios, Altamirano et al. 2011). L'ensemble de ces résultats démontre qu'en modifiant les sources de carbone typiques, il est possible d'obtenir un rendement supérieur en réduisant l'accumulation de métabolites nocifs, bien que cela soit souvent au détriment de la croissance cellulaire. Cette réduction peut engendrer une meilleure production spécifique ou avoir un effet bénéfique sur la durée des cultures (maintient de la viabilité). Il peut s'avérer aussi qu'avec un taux de croissance inférieur, les cellules soient capables de trouver un meilleur équilibre croissance/production puisqu'elles ne dépensent pas toute leur énergie à se multiplier. La relation inverse entre le taux de croissance et le taux spécifique de production décrite par (Berrios, Díaz-Barrera et al. 2009) semble abonder en ce sens.

### **1.3 Le génie métabolique dans le métabolisme primaire**

Le métabolisme primaire des cellules immortalisées est beaucoup moins efficace que celui des cellules hôtes. En effet, elles consomment une grande quantité de glucose qu'elles sont ensuite incapables de totalement oxyder, ce qui résulte en une accumulation de lactate nocif pour les cellules. Plusieurs approches métaboliques ont été proposées en vue d'altérer le métabolisme et favoriser la voie oxydative. Une grande partie de celles-ci reposent sur le pyruvate, souvent considéré comme la pierre angulaire du métabolisme primaire. Une réduction des déchets métaboliques est aussi possible en introduisant un gène permettant de varier les sources de carbone.

#### **1.3.1.1 La pyruvate carboxylase**

La pyruvate carboxylase (PC) est une enzyme généralement peu active dans les lignées cellulaires continues (Neermann and Wagner 1996; Bonarius, Ozemre et al. 2001). Cette enzyme

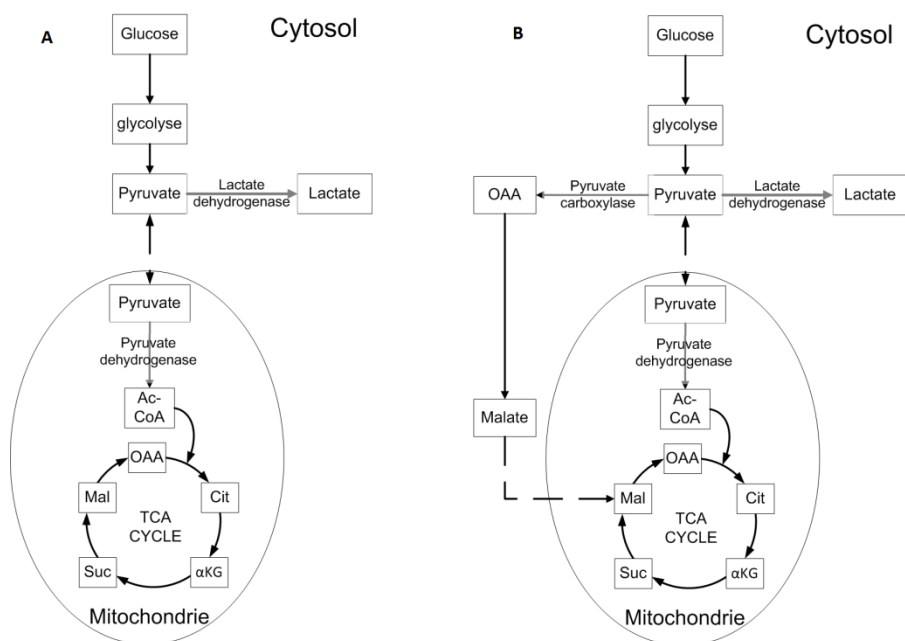


Figure 1.2 - Schéma réactionnel proposé par (Irani, Wirth et al. 1999) pour expliquer l'effet de PYC2. La figure de gauche présente le métabolisme normal, la figure droite illustre le métabolisme lors de la surexpression de la PYC2.

permet de transformer le pyruvate afin qu'il soit plus accessible pour le cycle de Krebs. Elle a donc été étudiée dans plusieurs lignées cellulaires. Issu de levures, le gène pyruvate carboxylase 2 (PYC2) a été introduit pour la première fois dans une lignée animale par Irani *et al.* (Irani, Wirth et al. 1999). Cette enzyme est cytosolique, contrairement à celle exprimé naturellement dans les cellules animales qu'on retrouve plutôt au niveau mitochondrial. La PYC2 catalyse la transformation du pyruvate en oxaloacétate, ce dernier étant ensuite oxydé en malate (par la malate déshydrogénase cytosolique) avant d'être acheminé au cycle TCA dans la mitochondrie (voir Figure 1.2). L'expression de l'enzyme dans des cellules BHK-21 semble avoir augmenté l'utilisation du cycle de l'acide citrique, ce qui a été suggéré par une production 1,4 fois plus grande d'ATP et une consommation accrue d'oxygène d'un facteur 2,9. Ce changement a eu pour effet d'améliorer l'efficacité du métabolisme cellulaire en réduisant les taux de consommation de glucose et de glutamine, ainsi qu'en diminuant la production de lactate (voir Tableau 1.2). Cette modification du métabolisme primaire est d'autant plus remarquable par le fait que la croissance cellulaire n'a pas été influencée par ces changements métaboliques et que la viabilité a même été prolongée de 2-3 jours. Ce métabolisme plus efficace a été maintenu en mode chemostat. De plus, la concentration cellulaire finale a été 2,5 fois plus élevée que pour la lignée parentale en mode perfusion. Le mode de culture n'amenuise donc pas les effets de la PYC2. Les cellules une

fois transfectées pour l'expression d'EPO n'ont pas perdu leurs propriétés et se sont avérées plus résistantes aux variations de glucose, étant capables d'atteindre leur productivité spécifique maximale à des concentrations beaucoup plus basses en glucose que les cellules parentales en mode perfusion. Ceci s'est traduit par une concentration finale en produit 2 fois plus élevée, notamment grâce à une productivité spécifique deux fois plus grande.(Irani, Beccaria et al. 2002). Par la suite, Le PYC2 a été introduit dans des cellules HEK-293 (Elias, Carpentier et al. 2003) et des résultats semblables ont été observés; il y a eu une meilleure utilisation du glucose et de la glutamine résultant en moins de lactate et d'ammoniac ce qui a permis une meilleure viabilité sans affecter le taux de croissance cellulaire. Par contre, dans ce cas, le rendement en produit n'a pas été amélioré. Une même tendance a été constatée pour des cellules CHO exprimant le PYC2 et cultivées en mode batch. Les taux de consommations étaient semblables aux cellules de contrôle, mais moins de métabolites nocifs ont été formés et une augmentation de la productivité spécifique par rapport au glucose a été observée, ainsi qu'une plus grande production d'ATP (1,2-1,3 fois plus). Toutefois, la croissance cellulaire et la concentration maximale en cellules ont toutes deux diminué. Les cellules exprimant le gène sont restées viables 2-5 jours de plus, ce qui a mené à une augmentation par un facteur 2 de la concentration finale en produit. De plus, en réduisant la température à 33°C, cela a permis d'augmenter la production par un facteur de 3,2 par rapport au cas de base (Fogolín, Wagner et al. 2004).

Un gène codant pour la pyruvate carboxylase humaine a été introduit dans des CHO. Cette enzyme être exprimé directement dans la mitochondrie. Cette modification a aussi mené à une réduction de la consommation de glucose et de la production de lactate et à une augmentation de la viabilité sans affecter la croissance.(Hyun and Lee 2007). Finalement, Henry et Durocher (Henry and Durocher 2011) ont démontré par une analyse de flux métabolique à l'aide de traceurs isotopiques qu'en introduisant le gène PYC2 dans des cellules HEK293, 82% du glucose consommé est envoyé au cycle de Krebs contre 51% dans le cas de la lignée parentale. Par contre, la méthode employée ne permet pas d'indiquer si une plus grande partie du pyruvate est effectivement alimentée au cycle de Krebs ou si les changements sont confinés uniquement au cytosol. Comme pour les études précédentes, cela se traduit par une réduction des taux de consommation de glucose ainsi qu'une réduction majeure (5,8 fois moins) du taux de production de lactate. La concentration finale d'ammoniac a aussi été réduite. Ces changements ont permis

d'augmenter la concentration maximale de cellule d'un facteur deux et d'augmenter la concentration finale en produit de près de 33%.

En somme, l'introduction de cette enzyme dans les lignées cellulaires animales induit des effets bénéfiques sur les cellules en réduisant de façon marquée la production des métabolites néfastes et en permettant d'allonger le temps de culture en maintenant la viabilité cellulaire. Elle permet aussi d'augmenter l'énergie disponible dans la cellule. Cette modification n'affecte pas la croissance cellulaire dans la plupart des cas et peut même augmenter la productivité spécifique ce qui la rend particulièrement intéressante pour les applications industrielles en mode fed-batch. Une mesure du taux de respiration cellulaire pourrait confirmer l'utilisation accrue du cycle de l'acide citrique, car elle confirmerait l'utilisation de la chaîne de phosphorylation oxydative et l'utilisation de l'OAA dans la mitochondrie (Seth, Hossler et al. 2006).

### **1.3.1.2 La lactate déshydrogénase**

La production de lactate à partir du pyruvate est catalysée par la lactate déshydrogénase. Étant donné que cette réaction est responsable de la majorité de la production de ce métabolite néfaste, plusieurs approches ont porté sur la LDH. Une réduction de l'expression du gène codant pour la LDH-A par recombinaison homologue dans des cellules hybridomes a permis de réduire de 50 % la production spécifique du lactate (Chen, Liu et al. 2001). Cette modification a également réduit la consommation du glucose de 25 %, en plus de stimuler la croissance et de doubler la productivité spécifique d'anticorps. L'activité de la LDH a pu être diminuée de 29 % dans des CHO lorsque de l'ARN antisens a été utilisé pour réguler l'expression de cette enzyme (Jeong, Kim et al. 2001). Cette modification a permis une meilleure régulation du pH interne des cellules tout en réduisant la production de lactate de moitié. Par l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA), l'activité de la LDH-A a été réduite de 75-89% dans des cellules CHO (Kim and Lee 2007). L'atténuation de ce gène a réduit la production du lactate, mais en maintenant le même rapport glucose/lactate et la même croissance du cas contrôle. La concentration finale de produit a augmenté de 1 à 2,2 fois, selon le clone. Dans ces études, le métabolisme de la glutamine est demeuré inchangé et l'accumulation de l'ammoniac n'a pas été réduite. Ce qui suggère que l'effet de cette modification a une moins grande portée que la PYC, car elle se limite à améliorer seulement une partie du métabolisme. Néanmoins, la réduction de lactate semble favoriser l'expression des molécules d'intérêt grâce à une plus grande stabilité du pH intracellulaire.

Tableau 1.2 - Comparaison des effets de la pyruvate carboxylase

	<i>PYC cytosolique</i>							<i>hPC mitochondrial</i>
	BHK-21			HEK-293			CHO	CHO
	Batch	Continu	Perfusion	Batch	Batch	Fed-Batch	Batch	Batch
	Facteur d'amélioration							
<b>Q<sub>glucose</sub></b>	1,4-4,0	1,8	1,5	1,84	1,1-1,3	1,1-1,3	1-1,5	1,2-1,7
<b>Q<sub>glutamine</sub></b>	1,1-1,8	1,4			1,7-2,5	2-4	0,8-0,9	
<b>Q<sub>lactate</sub></b>	1,6-2,6	2,3	2	5,8		2-4	1,2-1,5	1,3-1,6
<b>Q<sub>NH4</sub></b>						1,5-3		
<b>Produit final</b>	2		2	1,3	1		2	
<b>μ</b>	1	1	1,3	1	1	1	Diminue	1
<b>Ref.</b>	(Irani, Wirth et al. 1999, Irani, Beccaria et al. 2002)			(Henry and Durocher 2011)	(Elias, Carpentier et al. 2003)		(Fogolín, Wagner et al. 2004)	(Hyun and Lee 2007)

### **1.3.2 Remplacement des substrats assisté par l'ingénierie métabolique**

La substitution du glucose et de la glutamine par d'autres sources de carbone peut être bénéfique pour la production cellulaire tel qu'évoqué précédemment. Or, dans certains cas, la cellule ne possède pas l'ensemble de la machinerie métabolique nécessaire pour croître en utilisant un substrat alternatif qui pourrait lui être bénéfique. Par exemple, le glutamate ne peut remplacer la glutamine qu'en présence de glutamine synthétase. Cette enzyme est naturellement exprimée dans les CHO, mais n'est pas présente en quantités suffisantes dans les cellules NS0 pour permettre la croissance en présence de glutamate (Bell, Bebbington et al. 1995). L'introduction de la GS dans des hybridomes a éliminé la totalité de la production d'ammoniac lorsque les cellules étaient cultivées dans un milieu contenant du glutamate en remplacement de la glutamine (Paredes, Prats et al. 1999). La GS est maintenant couramment utilisée comme système de sélection pour les cellules NS0 et CHO. Ce gène est introduit dans les cellules simultanément avec le gène d'intérêt et les cellules sont ensuite mises en culture dans un milieu contenant du glutamate. Pour les cellules CHO, de la méthionine sulfoximine est ajoutée pour inhiber la production de GS de base. Les cellules qui survivent sont celles qui ont intégré le gène d'intérêt. Elles ont donc, en plus de la capacité d'exprimer le gène d'intérêt, celle de croître en présence de glutamate, ce qui réduit considérablement la production d'ammoniac.

Dans un même ordre d'idée, l'ajout du transporteur GLUT5 a permis de faire croître des cellules en présence de fructose tout en maintenant le même taux de croissance qu'en présence de glucose (Wlaschin and Hu 2007). Puisque l'affinité du fructose pour le transporteur GLUT5 est moins grande, la consommation de ce sucre se fait plus lentement et de façon plus efficace, ce qui réduit sensiblement la production de lactate. Cet effet a permis de prolonger la phase de croissance en mode fed-batch et de presque tripler la concentration cellulaire maximale. La production spécifique des cellules peut aussi être améliorée par l'expression de GLUT5 (Inoue, Tsukamoto et al. 2010).

### **1.3.3 Le retrait sélectif des déchets métabolique en cours de culture**

Alors que beaucoup de stratégies se concentrent sur l'élimination de la production des déchets métaboliques et l'établissement d'un état métabolique optimal, d'autres approches visent plutôt à éliminer les déchets au fur et à mesure de leur production pendant la culture.

L'utilisation d'une membrane hydrophobe permet de réduire l'accumulation de l'ammoniac. En effet, le  $\text{NH}_3$  est le seul composé capable de traverser les pores de cette membrane facilement. Il est ensuite capturé sous forme protonée ( $\text{NH}_4^+$ ) dans une solution acide. La pression partielle de ce composant est suffisante pour assurer le transport transmembranaire (Schneider, Alaoui et al. 1997). Cette technique a permis de réduire de 50 % la quantité d'ammoniac accumulée dans une culture d'hybridomes. La mise à l'échelle de cette technologie ou son utilisation dans un contexte industriel n'ont toutefois jamais été rapportées à ce jour.

La dialyse peut aussi être utilisée pour retirer les métabolites nocifs de la culture. Une boucle de recirculation contenant une chambre de dialyse est alors utilisée. Dans ce module, les petites molécules diffusent au travers d'une membrane selon leur gradient de concentration vers un liquide transporteur circulant à contre-courant. La molécule d'intérêt ne pouvant traverser la membrane est ainsi concentrée dans le milieu de culture alors que le lactate et l'ammoniac sont retirés. Le problème majeur de cette méthode est le manque de sélectivité de la membrane qui fait en sorte que les nutriments sont aussi retirés, il faut alors les alimenter en continu au réacteur.

## **1.4 Les stratégies de culture en mode fed-batch**

Plusieurs modes de culture sont possibles pour la culture en bioréacteurs. Le mode batch est limité par la quantité de nutriments qui peuvent être présents en début de culture sans atteindre des niveaux toxiques pour les cellules ou entraîner la production excessive de métabolites néfastes. L'épuisement d'un nutriment est donc souvent la cause de la fin de la croissance cellulaire. Les cultures en modes fed-batch, continu et perfusion permettent d'éliminer ces limitations nutritionnelles et d'obtenir de plus hautes concentrations en produit. Par contre, la complexité des systèmes de perfusion et continu représente un frein à leur application en industrie. Le mode fed-batch est préféré pour sa simplicité, sa robustesse et sa mise à l'échelle rapide (Bibila and Robinson 1995). Il existe différentes stratégies d'alimentation pour maximiser la croissance en culture fed-batch; les principales sont présentées dans cette section.

### **1.4.1 Le contrôle des nutriments à bas niveau**

Les stratégies les plus courantes mises en œuvre pour maximiser la production de protéines recombinantes sont basées sur l'augmentation de la durée de culture en minimisant la production



de déchets métaboliques. En maintenant des concentrations faibles en glucose et en glutamine, il est possible d'altérer le métabolisme des cellules animales et de le rendre plus efficace. Les cellules oxydent alors une plus grande part du glucose en  $\text{CO}_2$  et réduisent significativement la production de sous-produits nocifs. Zhou et ses collaborateurs furent parmi les premiers à induire ce changement dans des cellules animales (hybridomes) en maintenant d'abord le glucose à 0.5mM (Zhou and Hu 1994; Zhou, Rehm et al. 1995), puis la glutamine à 0.2mM (Zhou, Rehm et al. 1997). Graduellement au cours de la culture, il a été constaté que le métabolisme se déplace vers une plus grande utilisation du cycle de Krebs. La production de lactate s'en trouve presque éliminée alors que le rapport de consommation  $\text{O}_2$ /glucose augmente de façon significative et que la production d'ammoniac est fortement réduite. Cela a permis d'atteindre une concentration cellulaire maximale plus grande et de maintenir la viabilité des cellules plus longtemps et ainsi produire 250 mg/L d'anticorps par rapport à 8mg/L pour le cas de base.

Une stratégie similaire appliquée pour une culture de cellules de myélome de souris a conduit à l'obtention de résultats semblables. En maintenant le glucose et la glutamine à des niveaux très faibles, il a été possible de produire 9 fois plus d'anticorps qu'en mode batch grâce à un métabolisme plus oxydatif (Gambhir, Europa et al. 1999). Dans ce cas par contre, deux cultures consécutives en mode fed-batch ont été nécessaires pour obtenir ce métabolisme plus efficace. Afin de maintenir les concentrations désirées en nutriments, ces études ont utilisé la mesure en ligne du taux de respiration cellulaire (voir 1.5.2.1) pour déterminer la quantité de glucose à ajouter à l'aide d'un ratio défini. Cette méthode requiert un grand nombre de mesures hors-ligne pour ajuster ce ratio stœchiométrique qui est variable dans le temps. Le maintien du glucose à faible concentration jumelé à l'élaboration d'une solution d'alimentation basée sur un modèle stœchiométrique a aussi permis de réduire à seulement 3,7 % la conversion du glucose en lactate dans des hybridomes (Xie and Wang 1996). Cette étude a également mis en lumière l'importance des composants minoritaires dans la solution d'alimentation, puisque quelques changements de concentration au niveau des ions se sont traduits par une augmentation importante de la production en anticorps (plus de 2,4 g/L).

Enfin, récemment, le contrôle de cellules CHO à des niveaux limitants de glutamine a permis d'augmenter la production d'interféron de 10 fois, mais la qualité (sialylation) de la protéine s'en est trouvé altérée (Chee Fung Wong, Tin Kam Wong et al. 2005).

Le maintien de très faibles concentrations de nutriments laissent cependant peu de place à l'erreur, ce qui rend cette méthode difficile à appliquer à l'échelle industrielle. L'implémentation d'une stratégie manuelle d'alimentation sur des hybridomes murins n'a pas réussi à maintenir le glucose à une faible concentration, illustrant bien les difficultés inhérentes de cette méthode (Gong, Li et al. 2006). Toutefois, grâce à une bonne identification des nutriments limitants ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) et à leur ajout ponctuel, la phase de croissance cellulaire a duré deux fois plus longtemps et la concentration finale en anticorps monoclonaux a ainsi atteint une concentration 7 fois plus élevée qu'en mode batch. Ce qui introduit la prochaine stratégie pour prolonger la durée des cultures cellulaires, à savoir le design de solutions d'alimentation.

### **1.4.2 Le design des solutions d'alimentation**

L'élaboration des solutions d'alimentation est un facteur critique dans la culture en mode fed-batch. Une composition optimale doit permettre le maintien des concentrations du milieu de culture en évitant l'accumulation ou l'épuisement des éléments présents dans le milieu. Pour obtenir des solutions optimisées, une bonne connaissance du métabolisme et des taux de consommations cellulaires est essentielle (Wlaschin and Hu 2006). La façon la plus simple de concevoir une solution d'alimentation efficace, bien que non optimale, est de concentrer la composition du milieu de culture typiquement entre 10-15 fois. Cette méthode rapide assurera l'ajout de l'ensemble des nutriments nécessaires à la croissance. Par contre, elle ne prend pas en compte les besoins nutritionnels des cellules et peut facilement mener à l'accumulation d'ions qui peuvent augmenter l'osmolarité du milieu et inhiber la croissance et/ou la productivité (Bibila and Robinson 1995). C'est pourquoi il est préférable de développer les solutions d'alimentation par des approches plus rationnelles. Typiquement, un processus itératif est appliqué pour déterminer la composition optimale de l'ajout. Pour ce faire, les taux de consommation des composants du milieu sont estimés, puis une solution d'alimentation est élaborée de façon à rencontrer les besoins spécifiques des cellules. Une culture fed-batch est par la suite réalisée avec cette solution et les concentrations finales sont mesurées. Les nutriments présents en excès sont dilués alors que ceux qui sont absents sont concentrés et les taux de consommations sont estimés de nouveau. Le processus est ensuite répété et nécessite généralement plusieurs itérations avant d'être optimal, car les interactions entre nutriments sont négligées. Les concentrations de certains composants non mesurables dans la solution d'alimentation sont déterminées à l'aide de relations

empiriques ou par essai-erreur. La méthode itérative a été appliquée avec succès pour des CHO où les acides aminés sont limitants (Gorfien, Paul et al. 2003; Pacis, Vijayasankaran et al. 2010; Hu, Deng et al. 2011), des NS0 qui bénéficient plutôt de l'ajout de lipides (Spens and Häggström 2007) et même dans des lignées de cellules d'insectes (Meghrou, Mahmoud et al. 2009). L'analyse des composants dans le milieu de culture peut s'avérer un processus très coûteux et complexe. Pour arriver à des concentrations optimales plus rapidement, les méthodes des plans d'expériences (*design of experiments*) permettent de réduire le nombre d'itérations à l'aide de calculs d'interactions statistiques (Zhang, Wang et al. 2013). Il est aussi possible de formuler la composition de la solution d'ajout à l'aide de modèles cinétiques (Zhang, Shen et al. 2004) ou encore stœchiométriques (Xie and Wang 1996; Huang, Hu et al. 2010).

Bien que les solutions chimiquement définies soient préférées par l'industrie, d'autres ingrédients peuvent être ajoutés aux solutions d'alimentation. Les hydrolysats de plante sont des petits peptides provenant de la digestion de protéines et peuvent aider à remplacer le sérum dans les milieux de culture (Li, Vijayasankaran et al. 2010) ou même à substituer la glutamine, réduisant ce faisant la production d'ammoniac (Kim, Chaudhry et al. 2013). Huang *et al.* ont obtenu une concentration finale en anticorps monoclonaux de 13g/L avec une solution d'alimentation optimisée contenant des hydrolysats de plantes pour des cellules CHO (Huang, Hu et al. 2010). Bien qu'ils permettent d'obtenir de bons taux de production rapidement, ces ajouts varient cependant de lot en lot, ce qui les rend peu attrayants à l'instar du sérum. De plus, pour des cellules BHK cultivées en mode perfusion, l'optimisation d'un milieu chimiquement défini a permis d'obtenir des résultats presque identiques au milieu contenant des hydrolysats (Heidemann, Zhang et al. 2000).

## 1.5 Le suivi et le contrôle des cultures en mode fed-batch

Une fois la composition de la solution d'alimentation définie, il reste à définir la stratégie d'alimentation, c'est-à-dire déterminer la quantité de solution d'ajout à alimenter et à quel moment le faire pour éviter l'accumulation de nutriments et de déchets métaboliques dans le milieu. Idéalement, les ajouts doivent se faire au même rythme que la consommation, de façon à maintenir des concentrations constantes dans le milieu de culture. Pour obtenir ce régime quasi-permanent, plutôt que de suivre l'évolution de la concentration de chacune des espèces, on va habituellement se baser sur la concentration d'un nutriment de référence que l'on va chercher à

maintenir à un point de consigne par rétroaction (feedback) à l'aide d'une boucle de contrôle. Or, il demeure difficile d'implanter une telle boucle sur les bioréacteurs, car les mesures de concentrations sont souvent longues et laborieuses. Beaucoup de stratégies reposent sur des alimentations effectuées de façon ponctuelle et grâce à des mesures hors ligne. Cette stratégie s'avère souvent suffisante si la solution d'alimentation est élaborée correctement (Wlaschin and Hu 2006). Par contre, elle est susceptible d'induire de grandes variations au niveau des concentrations en présence, peut ne pas être assez précise pour induire les changements métaboliques décrits précédemment et entraîne une augmentation non désirable de l'osmolarité du milieu (Lu, Toh et al. 2013). Cette partie se consacrera aux différentes méthodes développées à ce jour pour optimiser le processus d'alimentation des cultures de cellules animales.

### **1.5.1 Les paramètres en ligne**

Le suivi en ligne des cultures animales en bioréacteur se limite souvent aux paramètres plus simples et facilement mesurables. Ainsi, la température, le pH et la concentration en oxygène dissous (DO) sont habituellement contrôlés, le plus souvent autour des conditions physiologiques. Nombre de paramètres nécessaires à l'optimisation et au contrôle des bioprocédés, telles que la concentration cellulaire et la composition du milieu requièrent le plus souvent une prise d'échantillon suivie de méthodes analytiques complexes effectuées *a posteriori*. C'est pourquoi la plupart des stratégies de contrôle sont basées sur des méthodes indirectes d'estimation du métabolisme, à l'aide de variables servant d'indicateurs physiologiques, comme le taux de respiration ou la variation du pH. Il existe quand même quelques méthodes continues ou semi-continues qui permettent de faire du suivi de cultures cellulaires dans une optique de contrôle.

#### **1.5.1.1 Mesure en ligne de la biomasse**

Dans la plupart des cultures cellulaires, la biomasse est le paramètre qui influence le plus la production de protéine recombinante. La croissance et la survie des cellules sont les principales préoccupations. Toutefois, les méthodes de mesures de concentration et de viabilité cellulaire disponibles en ligne sont rares. Le plus souvent, cela s'effectue par la mesure de la densité optique ou de la capacitance du milieu de culture.

La mesure de densité optique est l'option la moins onéreuse, elle mesure le changement d'absorbance du milieu. Cette mesure est par contre incapable de détecter la viabilité cellulaire en plus d'être inutilisable dans des milieux de culture trop opaques. La mesure de capacitance, quant à elle, utilise le fait que les cellules viables (dont la membrane plasmique est intacte) lorsque soumises à un champ électrique, sont polarisées agissant ainsi comme de petits condensateurs. La mesure de capacitance peut être ainsi reliée directement au biovolume, et par extension au nombre total de cellules viables. De plus, en utilisant une fréquence très élevée comme référence, ce type de sonde s'assure d'éliminer tous les autres types d'interférences qui pourraient fausser la mesure comme le bullage, l'agitation et le changement de volume. Par contre, le changement de morphologie des cellules au cours de la culture affecte la mesure. La corrélation entre le signal et la biomasse doit donc être ajustée pour en tenir compte (Cannizzaro, Gügerli et al. 2003). Plusieurs types cellulaires ont été suivis par cette technologie. Récemment, des mesures de capacitance ont été utilisées conjointement avec des mesures de glucose pour implémenter une stratégie d'alimentation (Lu, Toh et al. 2013). Elle demeure néanmoins une technologie relativement nouvelle qui demeure complémentaire aux mesures hors ligne (Kiviharju, Salonen et al. 2007). La technologie de microscopie holographique digitale en 3D permet le suivi dans le temps et l'espace des cellules (Frank, Catherine et al. 2008).

L'utilisation de la cytométrie en flux de façon automatisée semble aussi un outil prometteur pour le suivi de la biomasse, car elle permet d'obtenir de l'information sur le cycle cellulaire (Kuystermans, Mohd et al. 2012).

#### **1.5.1.2 Les mesures en ligne des composants extra-cellulaires**

Afin d'estimer en temps réel l'état métabolique des cellules, la mesure en ligne des principaux composants du milieu de culture est souhaitable pour quantifier les taux de consommation et de production des cellules. Cette information est cruciale pour toute stratégie de contrôle visant à alimenter les cultures de façon à répondre directement aux besoins nutritionnels de la cellule. L'estimation des concentrations dans les milieux de culture demeure encore aujourd'hui un processus difficile.

À ce jour, très peu de méthodes de mesures *in situ* (à l'intérieur du bioréacteur) des nutriments existent à l'échelle industrielle, principalement à cause de la dégradation des biocapteurs pendant les cycles de stérilisation traditionnels à haute température (Becker,

Hitzmann et al. 2007). Les mesures *ex situ* requièrent quant à elle beaucoup d'équipements difficiles à entretenir et augmentent considérablement les risques de contamination du bioréacteur. Elles sont toutefois le meilleur moyen disponible pour l'instant pour obtenir des mesures de concentration des métabolites de façon quasi-continue. La méthode de fonctionnement est assez simple et est illustrée dans la figure ci-dessous. D'abord, le milieu de culture est pompé au travers d'un dispositif de filtration pour maintenir la stérilité du bioréacteur et s'assurer que le fluide envoyé aux analyses est exempt de cellules. Certaines méthodes de mesure pompent le fluide en continu et le recirculent entre chaque temps d'analyse, alors que d'autres pompent le fluide seulement lorsque nécessaire et n'ont pas besoin de boucle. Le système de filtration est généralement un filtre tangential ou bien un filtre de céramique. Enfin, les outils d'analyses du milieu sont un peu plus diversifiés selon les métabolites que l'on désire mesurer et les principaux sont présentés ici.

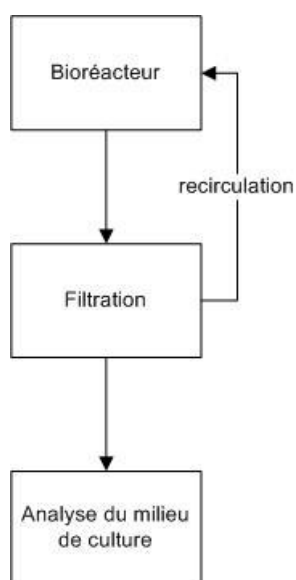


Figure 1.3 - Schéma général d'un système de mesure *ex situ*

La technique d'analyse en flux d'injection continu (*flow injection analysis* ou FIA) est l'une des méthodes les plus utilisées pour mesurer les concentrations de façon quasi-continue dans les bioprocédés. Il s'agit d'ajouter l'échantillon à analyser dans une solution de transport contenant un réactif et de l'envoyer à un détecteur par la suite. Par exemple, une mesure de glucose peut être faite en mélangeant l'échantillon dans une solution tampon et par la suite dans une solution de 1,1'-dimethylferricinium ( $\text{DMFe}^+$ ). Le mélange est ensuite envoyé dans une chambre contenant l'enzyme glucose oxydase immobilisée et le courant résultant de l'oxydation

est mesuré pour déterminer la concentration (Male, Gartu et al. 1997). Cette technique permet de mesurer une grande variété de composés, car presque n'importe quel capteur peut être utilisé (Becker, Hitzmann et al. 2007). Par contre, elle requiert beaucoup d'optimisation avant de pouvoir obtenir des résultats reproductibles. L'entretien nécessaire au bon fonctionnement du FIA est aussi un frein à son application industrielle.

Une autre méthode adaptable en ligne pour déterminer les concentrations des métabolites est la chromatographie liquide haute performance (*high performance liquid chromatography* ou HPLC). Cette méthode permet de mesurer une grande variété de composants. Par contre, elle requiert une étape exhaustive de calibration et est très dispendieuse. Elle a été mise en œuvre avec succès pour suivre l'évolution du glucose, de la glutamine et du lactate simultanément (Kurokawa, Park et al. 1994). Afin de ne pas encombrer la colonne, il est généralement nécessaire de prétraiter les échantillons afin de neutraliser les protéines ce qui rend l'application en ligne encore plus difficile.

Une méthode rapide pour mesurer la concentration de certains composants est l'utilisation de membranes enzymatiques. Une enzyme est fixée sur une électrode et réagit spécifiquement à un composé ce qui induit un changement de potentiel qui peut être corrélé à la concentration. Cette mesure est réalisable en quelques minutes et l'instrumentation est relativement peu onéreuse. C'est pourquoi elle est maintenant largement répandue dans les différents systèmes de mesure en ligne (voir prochaine section). Bayers a utilisé cette technologie dans un système complètement automatisé de contrôle pour mesurer le lactate et le glucose (Chong, Saghafi et al. 2013). Cette technologie demeure limitée par la durée de vie des membranes enzymatiques et par la diminution d'efficacité de celles-ci dans le temps, ce qui requiert des calibrations fréquentes.

Plusieurs méthodes de mesures *in situ* sont présentement en développement. Les méthodes basées sur la spectroscopie infrarouge semblent le plus près de se développer, car elles sont capables de mesurer en continu de façon non destructrice et les instruments requis peuvent être stérilisés à l'autoclave (Teixeira, Oliveira et al. 2009). La spectroscopie Raman, par exemple, a récemment été utilisée pour mesurer la glutamine, le glutamate, l'ammoniac, le glucose, le lactate, la concentration cellulaire et la viabilité (Abu-Absi, Kenty et al. 2011). Par contre, l'erreur sur les mesures est encore assez grande (parfois autour de 30 %) et beaucoup de données sont nécessaires pour calibrer la méthode.

## 1.5.2 Le contrôle des cultures par des méthodes de suivi indirect

Comme il a été mentionné, l'implémentation de mesures continues et directes de l'état métabolique des cellules augmente de façon considérable la complexité de l'équipement nécessaire à la culture. C'est pourquoi, beaucoup de boucles de contrôle reposent sur l'utilisation de paramètres simples et facilement mesurables et permettant d'estimer de façon indirecte le métabolisme cellulaire.

### 1.5.2.1 Le contrôle des cultures par l'estimation du taux de respiration

Le taux de respiration est sans doute la mesure en ligne la plus utilisée à titre d'indicateur physiologique des cultures ou pour estimer la biomasse (Wlaschin and Hu 2006). Seulement une sonde à oxygène dissous est requise pour estimer la quantité d'oxygène consommée par les cellules par la méthode dynamique (expliquée en détail au chapitre 2). Un bon nombre de publications ont utilisé ce paramètre pour tenter de maintenir une concentration en nutriment constante dans le milieu de culture. Pour ce faire, il suffit de connaître le rapport stœchiométrique entre la demande en oxygène des cellules et le nutriment de référence et d'alimenter en conséquence. Il faut sans cesse réajuster ce rapport, car il a tendance à varier au cours des différentes phases de culture. Néanmoins, plusieurs études ont réussi à maintenir un point de consigne et même à induire un changement métabolique (*metabolic shift*) par cette méthode, comme discuté précédemment (Zhou, Rehm et al. 1997; Gambhir, Europa et al. 1999). Plus récemment, Aehle *et al.* (Aehle, Schaepe et al. 2011) ont réussi à l'aide d'un contrôleur adaptatif à maintenir un taux de croissance constant pour des cellules CHO. Effectivement, en ajustant une alimentation de glutamine, il a été possible à l'aide de cette mesure en ligne de maintenir la croissance sur la trajectoire voulue. Une boucle de contrôle basée sur la consommation d'oxygène a également été implantée afin d'optimiser la production de baculovirus dans des cellules d'insectes (Lecina, Soley et al. 2006). La connaissance de l'état métabolique des cellules a permis de déterminer le temps le plus propice à l'infection. En mode perfusion, une stratégie d'alimentation basée sur la demande en oxygène a augmenté la production spécifique de virus d'un facteur 4.3 fois dans des cellules HEK293 (Gálvez, Lecina et al. 2012). Somme toute, une stratégie de contrôle basée sur des mesures de consommation d'oxygène fonctionne très bien à l'échelle du laboratoire, notamment parce que le coefficient de transfert de matière est facile à déterminer dans les conditions étudiées. La mise à l'échelle de telles stratégies peut toutefois



s'avérer laborieuse à cause des variations de ce coefficient dont il faudra tenir compte dans des conditions moins homogènes de bullage (Wlaschin and Hu 2006).

### **1.5.2.2 Le contrôle des cultures par corrélation avec les variations de pH**

Le pH est un autre paramètre mesuré de façon routinière pendant les cultures cellulaires. La principale cause de variation de celui-ci est la production de lactate par les cellules. Pour contrer cette acidification du milieu, une solution de base est ajoutée dans le bioréacteur. Or, cette quantité peut être suivie en temps réel ce qui permet son utilisation comme indicateur de la croissance cellulaire. Par un rapport stœchiométrique entre le lactate et la quantité de solution alcaline ajoutée, puis entre le lactate et le glucose, il devient possible d'estimer la consommation de glucose. Ce nutriment a ainsi pu être maintenu à une concentration très faible dans une culture de cellules hybridomes (Oh, Izuishi et al. 1996), menant à une réduction de la production de lactate. Bien que cette méthode ait fonctionné dans le cadre de cette étude, elle comporte néanmoins plusieurs limites. Tout d'abord, comme le milieu de culture est généralement très tamponné, une grande quantité de métabolite doit être produite avant d'en percevoir l'incidence sur le pH. Le contrôle ne peut donc pas se faire de façon très fine, car la variable mesurée n'est pas très sensible. Une autre méthode développée utilise quant à elle le pH directement comme variable de contrôle. Gagnon et ses collaborateurs (Gagnon, Hiller et al. 2011) ont en effet exploité la propension des cellules CHO-K1 à consommer le lactate lorsqu'il n'y a plus de glucose disponible dans le milieu pour implanter une boucle de contrôle dont le fonctionnement est simple : lorsque le glucose est absent du milieu de culture, le pH augmente dû à la consommation de lactate et l'alimentation de glucose est alors démarrée. Puis, lorsque le glucose est en quantité suffisante, les cellules le consomment et produisent du lactate ce qui diminue le pH causant un arrêt de l'alimentation. Cette boucle de contrôle a permis de maintenir une concentration non détectable de glucose dans le bioréacteur qui a eu pour effet d'augmenter la productivité spécifique des cellules, sans affecter la qualité du produit. Toutefois, les cellules ont produit plus d'ammoniac. Cette boucle de contrôle est prometteuse, mais elle ne pourra s'appliquer aux cellules qui ne consomment pas de lactate. De plus, elle ne permet pas le contrôle du pH autour d'un point de consigne, mais plutôt autour du point où la consommation de lactate débute, ce qui pourrait s'avérer contre-productif pour certaines lignées cellulaires.

### 1.5.3 Le contrôle des cultures par mesure directe

L'implémentation d'une boucle de contrôle dans le cas d'un nutriment dont la concentration est directement mesurée s'avère assez simple par le biais d'un contrôleur classique PID, du moment que la fréquence d'échantillonnage est suffisamment élevée. Comme expliquée précédemment, la difficulté réside dans l'obtention de mesures fiables de concentration, sans compromettre l'asepsie du système de culture. Des mesures de glucose et de glutamine effectuées toutes les 1,5h grâce à deux analyseurs enzymatiques YSI 2700 ont permis un contrôle indépendant à très basses concentrations de ces deux sources de carbone pour des cultures de cellules CHO (Chee Fung Wong, Tin Kam Wong et al. 2005). Cette stratégie de contrôle a démontré que des concentrations limitantes en glucose peuvent augmenter la consommation de glutamine et la production d'ammoniac et qu'il n'est donc pas toujours souhaitable de maintenir ces deux nutriments à de faibles concentrations. De plus, les très basses concentrations de glucose (en deçà de 0,70mM) et de glutamine (en deçà de 0,3mM) affectent la glycosylation de l'interféron produit. Dans cette étude, la concentration finale de produit était de 10 fois supérieures au mode batch dans le cas où la glutamine était maintenue à 0.3mM sans limiter la concentration de glucose. Dans des lignées humaines de PER.C6, un contrôle simultané du glucose et de la glutamine à l'aide de mesure par deux YSI2700 a permis d'induire un changement métabolique (Maranga and Goochee 2006). Il en est résulté une élimination totale de la production de lactate et un métabolisme oxydant complètement chaque molécule de glucose consommée sans affecter pour autant le taux de croissance. Dans ce cas-ci, le contrôle de la glutamine à bas niveau n'a pas eu d'effet significatif sur la culture cellulaire et la majorité des bénéfices observés était due à la faible concentration en glucose. Pour des cellules CHO, une stratégie de contrôle complètement automatisée réalisée dans un premier temps en utilisant la mesure de capacitance (biomasse) comme outil de contrôle et dans un deuxième temps la concentration en glucose a démontré que cette dernière constituait un meilleur indicateur du métabolisme des cellules (Lu, Toh et al. 2013). L'optimisation de la solution d'alimentation couplée au maintien de la concentration de glucose à un niveau de 2 g/L a permis d'augmenter à 9 g/L la production d'anticorps, soit une concentration finale 2 fois plus élevée que le cas de base. Une stratégie d'alimentation continue n'a toutefois pas eu d'effet sur une autre lignée de CHO par rapport à un mode d'alimentation sous forme de simples ajouts ponctuels. L'ensemble de ces résultats indique qu'il est peu probable que soit définie une stratégie de contrôle d'application

universelle. En effet, les limitations nutritionnelles n'ont pas toujours des effets bénéfiques selon le type cellulaire et/ou les conditions de culture. De plus, les résultats suggèrent que les stratégies implantées pourraient même être simplifiées puisque le contrôle d'un seul nutriment est parfois suffisant pour induire un état favorable à l'expression de protéines recombinantes. Tout porte donc à croire qu'une étude approfondie du métabolisme cellulaire de chaque lignée est absolument nécessaire pour sous-tendre le développement d'une stratégie de contrôle efficace.

#### **1.5.4 Protocole d'alimentation défini *a priori***

L'alimentation d'une culture fed-batch peut se faire sans avoir recours à des mesures en ligne. Une trajectoire d'alimentation doit alors être prédéfinie avant même le début de la culture. Il existe deux types de stratégie : définir le débit d'alimentation selon une fonction simple (exponentielle, linéaire, constante) ou le définir par le biais d'un modèle cinétique complexe en cherchant à maximiser la production.

Une stratégie d'alimentation fixe est très facile à implanter, par contre, quelques cultures sont nécessaires avant d'obtenir des résultats acceptables. De plus, comme la stratégie n'est pas adaptée à chaque culture, mais basée sur un comportement *a priori*, il est possible que la quantité de nutriments alimentés soit sous-optimale. En plus, durant la phase de déclin, il y a un risque élevé d'accumulation des nutriments. Cette stratégie est donc recommandée seulement lorsque les conditions de cultures varient très peu d'une culture à l'autre et dans les cas de cultures bien établies (Portner, Schwabe et al. 2004).

Établir une stratégie d'alimentation en fonction des prédictions d'un modèle est une autre option pour minimiser les manipulations nécessaires durant la culture en bioréacteur. Pour ce faire, il faut d'abord développer un modèle cinétique minimalement capable de décrire la croissance et la production des cellules en fonction des substrats disponibles. Or, selon la complexité du modèle, une quantité appréciable de données peut être nécessaire à son développement, à sa calibration et à sa validation. Par contre, il permet en principe d'obtenir une composition et une stratégie d'alimentation optimisée. Le défi repose sur l'obtention d'un modèle cinétique robuste ayant une réelle capacité prédictive (Aehle, Kuprijanov et al. 2011).

Les paramètres d'un modèle cinétique peuvent être ajustés en temps réel aux conditions mesurées dans la culture. Ce sont ces méthodes de contrôle utilisant des « observateurs » qui seront discutés brièvement dans la prochaine section.

### 1.5.5 Le contrôle aidé par des modèles

Le métabolisme cellulaire est dynamique, il tend à changer au cours d'une culture cellulaire. Or, la plupart des méthodes de contrôle énoncées ci-haut utilisent des rapports stœchiométriques entre une quantité mesurée et un nutriment pour déterminer l'alimentation à ajouter. Ce rapport est influencé par les fluctuations du métabolisme, il faut donc l'ajuster.

Les changements métaboliques importants comme la consommation de lactate ou une plus grande oxydation du glucose au cours d'une culture peuvent complètement changer les taux des consommation. Ce phénomène peut ainsi causer une suralimentation ou une sous-alimentation. L'idéal pour éviter ce problème serait de connaître l'ensemble du métabolisme en temps réel. L'utilisation d'observateur permet à l'aide de logiciel d'estimer de façon continue l'état métabolique des cellules à l'aide de mesures discrètes (Wlaschin and Hu 2006). L'idée derrière l'ensemble de ces logiciels est d'ajuster les paramètres d'un modèle chaque fois qu'une nouvelle information devient disponible pour déduire l'état du système. Une variété d'observateurs a déjà été appliquée aux cultures microbiennes, mais pour les cellules mammifères très peu d'approches ont été tentées à cause de la complexité des modèles métaboliques. Le filtre de Kalman étendu (Pelletier, Fonteix et al. 1994) et les estimateurs récurrents (Henry, Kamen et al. 2007) sont des exemples d'observateurs qui ont été appliqués. Il en existe une panoplie, mais la majorité n'a jamais été utilisée en pratique et demeure basée sur des simulations (Dochain 2008).

Une approche pour contrôler un système biologique est le contrôle prédictif. Ce type de contrôle, le plus souvent basé sur des modèles très simples, vise à entreprendre des actions au moment présent pour obtenir un résultat dans un temps futur (appelé horizon de prédiction). Cette approche a été implantée dans des réacteurs perfusion à l'aide de mesures du glucose en ligne pour maintenir un point de consigne sur ce nutriment (Dowd, Weber et al. 1999; Dowd, Kwok et al. 2001). Elle a l'avantage de ne pas nécessiter d'information *a priori* sur le système. Par contre, le contrôle prédictif ne permet pas d'optimisation, car le modèle ne fait qu'estimer le comportement du système entre deux mesures.

Le contrôle adaptatif est un autre type de contrôle basé sur un modèle qui ne requiert pas d'information préalable à la culture. Il modifie les paramètres du contrôleur de façon à s'adapter à la dynamique changeante du procédé. Encore une fois, il ne permet pas d'optimisation, car il ne fonctionne qu'en boucle fermée pour maintenir un point de consigne. Il a été utilisé avec succès pour contrôler à bas niveau le glucose dans des cultures de cellules HEK293, par le biais d'un système FIA permettant la prise automatique de mesures toutes les 30 min (Siegwart, Côté et al. 1999).

Une nouvelle stratégie combinant toutes ces approches a été développée, le contrôle *open-loop-feedback-optimal* (OLFO) dont le fonctionnement est illustré ci-dessous.

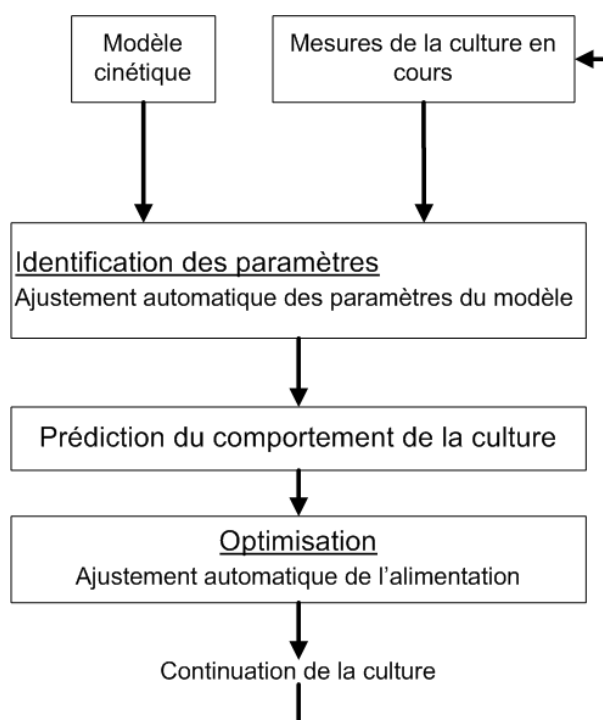


Figure 1.4 - Schéma général d'un contrôle OLFO

Le modèle utilisé pour un contrôle OLFO doit être capable de bien décrire la culture, puis être en mesure de s'ajuster à différentes trajectoires de la biomasse à l'aide de quelques paramètres de mesures. Enfin, il doit être capable de prédire adéquatement la culture pour pouvoir prédire l'alimentation, sans toutefois compromettre l'identification de ces paramètres (Becker, Hitzmann et al. 2007). Le principal avantage d'un contrôleur OLFO par rapport aux autres types de contrôleur est qu'il permet l'optimisation de plusieurs critères. Effectivement, puisque le contrôle débute à l'aide d'un modèle, c'est à l'utilisateur de choisir son critère

d'optimisation, le contrôleur ne fera que s'ajuster légèrement pour maintenir ce critère en fonction des conditions réelles. Ainsi, il est possible de vouloir maximiser la croissance ou bien la production, plutôt que simplement conserver un point de consigne. Une stratégie OLFO a ainsi réussi à maintenir des concentrations suffisamment basses de glutamine et de glucose pour améliorer la croissance et la production (Frahm, Lane et al. 2002). Pour identifier le système, une méthode proposant un poids variable aux différentes mesures hors ligne en minimisant la somme des moindres carrés a été utilisée. En choisissant la production volumétrique par heure maximale comme critère d'optimisation et en calculant une trajectoire pour l'alimentation, une concentration finale supérieure de 40 % au cas précédent a été obtenue et le facteur optimisé a augmenté de 70 % (0,0285 à 0,483 mg/L.h) (Frahm, Pörtner et al. 2005). Cet algorithme est complexe, mais il ne requiert pas de mesures en continu et peut donc être établi à partir de mesures hors ligne. De plus, le modèle utilisé est relativement simple (16 équations et 14 paramètres variables) ce qui implique que peu d'expériences de calibration seront requises pour déterminer les paramètres.

Les stratégies de contrôle sont de plus en plus étudiées dans les bioprocédés cellulaires. Les observateurs qui permettent d'estimer le métabolisme cellulaire de façon continue sont encore peu utilisés. Pourtant, avec cette information dans une boucle de contrôle, il serait possible d'optimiser la composition de l'alimentation en temps réel. D'un point de vue pratique, cela demeure un idéal, mais il peut être intéressant de tenter de les appliquer.

## CHAPITRE 2 RECHERCHE D'UNE SOLUTION D'ALIMENTATION

Une stratégie d'alimentation en mode fed-batch permet en principe de prolonger la durée des cultures et d'obtenir une production supérieure au mode batch. Toutefois, afin de définir la composition d'une solution d'ajout conduisant à des améliorations substantielles pour les implanter sur des cultures en bioréacteur, des expériences en flacons ont été effectuées au préalable à petite échelle. Ce chapitre fait état succinctement des principaux travaux de développement ayant permis d'élaborer la stratégie d'alimentation utilisée dans l'article présenté dans ce mémoire.

Idéalement, la composition de la solution d'ajout et le protocole d'alimentation doivent permettre d'éviter l'épuisement des composants du milieu, sans pour autant qu'il y ait une accumulation de ceux-ci ou une production excessive de déchets métaboliques. Différentes méthodes pour obtenir ce type de solution ont été revues dans le chapitre précédent. Or, beaucoup d'entre elles reposent sur l'utilisation de méthodes analytiques complexes pour quantifier la majorité des composants du milieu. Puisque ces moyens n'étaient pas tous accessibles dans le contexte de cette étude, le travail s'est effectué suivant un processus se déclinant en trois étapes itératives : l'ajout de nutriments non limitants, l'ajout d'un seul nutriment limitant et l'ajout simultané de glucose et de glutamine. Puis, une fois le choix fait, les rapports stœchiométriques des nutriments ont été déterminés.

### 2.1 Protocole

Les conditions de culture étaient semblables pour toutes les expériences décrites dans cette section, elles sont identiques aux méthodes décrites dans l'article pour les cultures en flasques. Le développement de la solution d'alimentation s'est fait entièrement avec les cellules exprimant la pyruvate carboxylase. Les cellules 293-F5 sont inoculées à  $0,2 \times 10^6$  cellules/ml dans des flacons de 125 ml, lesquels sont incubés à 37 °C sur une plaque agitatrice tournant à 120 rpm. Les cellules sont cultivées dans 20 ml de milieu Freestyle F17 supplémenté de 4mM de glutamine, 1 % pluronic et 0,1 % d'un agent anti-agrégation (anti-clumping agent). La concentration et la viabilité cellulaire sont déterminées sous le microscope avec un hémacytomètre par la méthode de coloration au bleu de trypan. Les concentrations de glutamine, glutamate, glucose et lactate ont été analysées à l'aide d'un analyseur biochimique YSI 2700. La

composition des solutions d'alimentation varie entre chaque expérience et est décrite dans chaque cas.

## 2.2 Ajout de nutriments non limitants

Dans une première étape, afin de déterminer la composition de la solution d'alimentation deux types de nutriment ont été comparés entre eux pour identifier leurs effets sur la croissance cellulaire. À l'aide de cocktails prédéfinis de vitamine (R-7131) et d'acide aminé (R-7256) disponibles commercialement (Sigma-Aldrich), un protocole simple a été réalisé. Les solutions étaient ajoutées quotidiennement dans la culture de cellules suivant les concentrations recommandées par le fabricant. Ainsi, quatre cultures ont été obtenues : une culture contrôle, et trois cultures alimentées par des ajouts de vitamines, d'acides aminés et un mélange des deux. Les résultats de la croissance sont illustrés dans la figure ci-dessous.

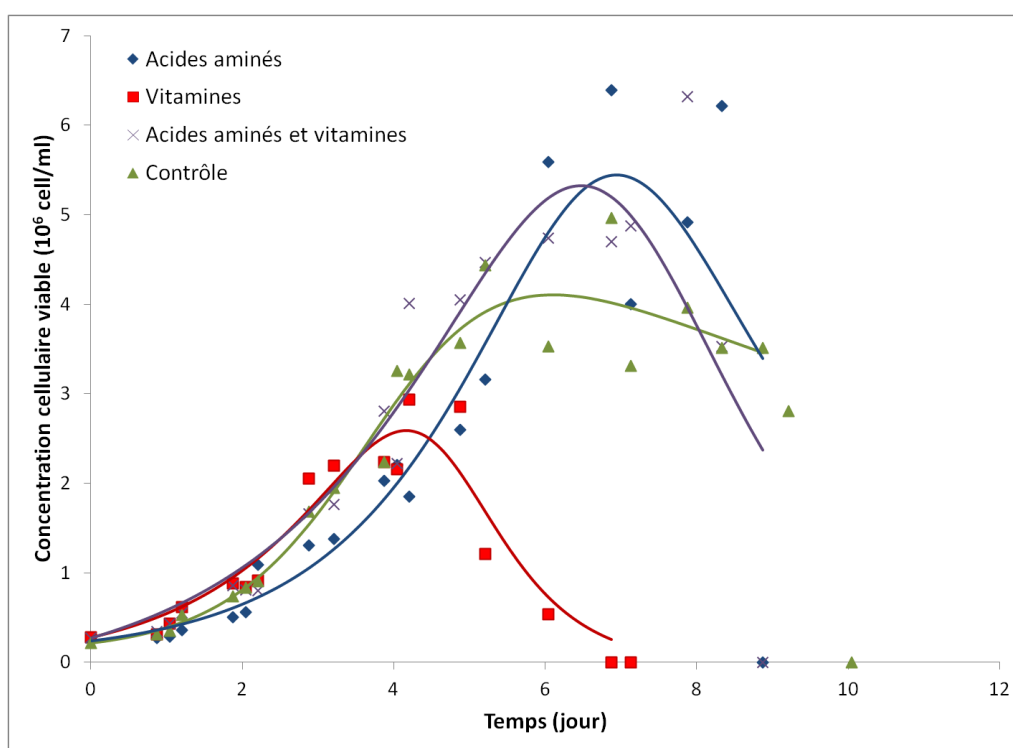


Figure 2.1 - Profil de croissance en fonction des différents cocktails de nutriments ajoutés

On peut constater que les acides aminés semblent avoir un impact positif sur la croissance cellulaire par rapport au contrôle, alors que les vitamines ajoutées seules ont clairement un impact négatif. Le cocktail contenant un mélange des deux types de nutriments semble avoir lui



aussi un impact positif, ce qui suggère que la solution de vitamine pure (milieu acide) était peut-être trop concentrée. Il est aussi possible qu'un effet sur le pH de la solution de vitamine ait été neutralisé par les tampons présents dans le cocktail d'acide aminé. Malheureusement, le pH n'a pas été mesuré au terme de ces cultures. Par ailleurs, les améliorations observées étaient modestes et potentiellement uniquement attribuables à la variabilité inhérente au compte cellulaire. Pour pouvoir mieux cerner les effets à plus long terme de ces cocktails, d'autres cultures en flacons ont été conduites.

### **2.3 Ajout d'un seul nutriment limitant**

Une seconde série d'expériences visait à déterminer si la croissance était possible avec seulement un nutriment principal présent dans la solution d'ajout. Le glucose ou la glutamine ont donc été maintenus à des niveaux non limitants pour les cellules 293-F5 en ajoutant 1 ml de solution concentrée à chaque échantillon. De plus, afin de vérifier l'effet à long terme des nutriments testés précédemment, ces derniers ont aussi été ajoutés en même temps que les sources de carbone. Enfin, une solution commerciale de CD CHO Efficientfeed™ (Life Technologies) contenant du glucose, mais sans glutamine a été utilisée pour des fins de comparaison. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.1 en termes de l'intégrale de la concentration cellulaire viable (IVCC) obtenue pour chacune des conditions testées. L'IVCC représente l'aire sous la courbe de croissance et est généralement en lien direct avec la production du produit d'intérêt, c'est pourquoi elle est utilisée comme base de comparaison ici. Les courbes de croissance sont fournies à l'annexe 1.

Tableau 2.1 - Comparaison entre les différentes solutions d'alimentation contenant une seule source de carbone

Solution d'alimentation	IVCC  (10 <sup>6</sup> cell x h/ml)	X <sub>max</sub>  (10 <sup>6</sup> cell/ml)
Glucose + acides aminés	1077	8,6
Efficientfeed <sup>TM</sup>	972	8,3
Glucose	748	5,3
Glucose + Vitamines	694	5,3
<b>Contrôle</b>	<b>687</b>	6,4
Glutamine + acides aminés	577	7,1
Glutamine	564	4,7
Glutamine + Vitamines	560	4,8

L'alimentation des cultures par des solutions contenant de la glutamine a diminué dans tous les cas la quantité de cellules produites par rapport au contrôle. Ce résultat est probablement attribuable à l'accumulation excessive d'ammoniac dans le milieu de culture qui peut avoir atteint une concentration inhibitrice. En effet, les cellules en l'absence de glucose ont sans doute consommé plus de glutamine pour répondre à leurs besoins énergétiques et produit plus d'ammoniac en conséquence. Il est cependant impossible de vérifier cette hypothèse, car le niveau final d'ammoniac n'a pas été mesuré. A la lumière des résultats, l'ajout de glucose permet de prolonger la durée des cultures comme en témoignent les IVC élevés. Il faut cependant

souligner que le glucose présent permet seulement de maintenir la viabilité, la croissance s'arrêtant aussitôt que la glutamine est épuisée du milieu de culture. L'ajout d'autres nutriments combinés au glucose est aussi bénéfique, car les acides aminés et la solution commerciale permettent de prolonger encore plus la durée de la culture. Encore une fois, les vitamines, à la concentration utilisée, ne semblent pas bénéfiques pour la prolifération cellulaire.

## 2.4 Ajout simultané de glucose et glutamine

Une autre expérience en fed-batch avait pour objectif de maintenir le glucose et la glutamine à des niveaux non limitants. En effet, puisque la glutamine semble nécessaire à la croissance et le glucose à la survie, il était intéressant de voir s'il était possible de prolonger la phase de croissance des cellules. Pour maintenir le glucose et la glutamine à des niveaux non limitants, la concentration était mesurée à chaque échantillon. Puis, les quantités nécessaires de glutamine et de glucose étaient ajoutées en fonction des prédictions du modèle prédictif expliqué dans l'article. Parallèlement, 2 ml de solution d'acide aminé (ou de la solution commerciale) étaient ajoutés tous les 2 jours. Ce protocole a permis de réduire considérablement l'accumulation de nutriments dans le milieu. Les résultats des duplicatas sont présentés dans la figure ci-dessous.

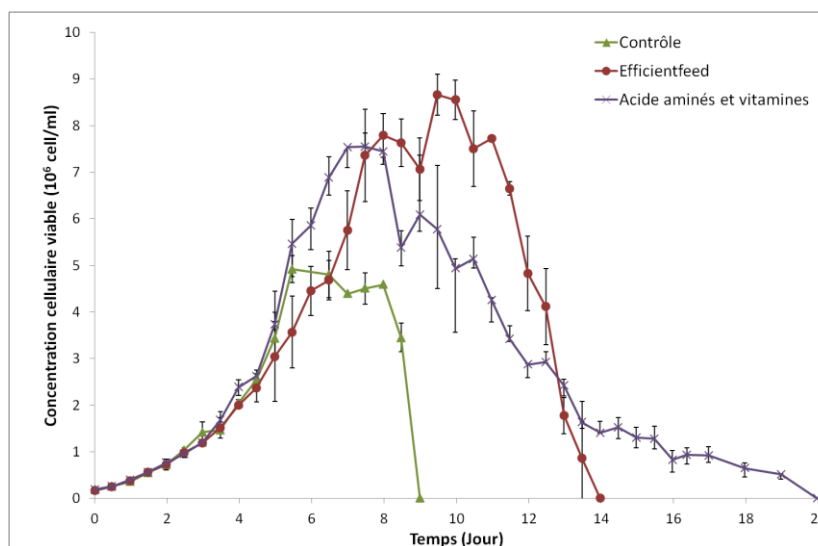


Figure 2.2- Profil de croissance en fonction des différentes alimentations en maintenant le glucose et la glutamine à des niveaux non limitants

Les deux solutions utilisées ont donné des résultats satisfaisants et ont permis de considérablement allonger la phase de croissance. L'ajout simultané de glucose et de glutamine était donc souhaitable. Le comportement des cellules diffère entre les deux types d'ajout utilisés. La solution commerciale augmente davantage la croissance alors que la solution d'acides aminés permet de maintenir la viabilité plus longtemps. Faire un choix en fonction de ces résultats était difficile, alors un autre protocole identique, mais cette fois avec une alimentation de 1 ml/jour (au lieu de 2ml/2jours) de solutions d'alimentation a été réalisé. Dans ce cas, la culture alimentée par la solution d'Efficientfeed™ était plus longue et atteignait une densité cellulaire maximale supérieure aux autres conditions. C'est donc l'usage de cette solution qui a été adopté pour la suite des travaux.

## **2.5 La composition de la solution d'alimentation**

Au moment du changement d'échelle, pour des raisons d'ordre pratique, le recours à une seule bouteille d'alimentation s'avérait nécessaire. Il fallait donc combiner l'Efficientfeed à la glutamine de façon à en prévenir l'épuisement ou l'accumulation. Le bruit de mesure rend l'obtention du rapport stœchiométrique reliant la consommation de deux nutriments difficile à établir à partir des taux de consommation ponctuels. C'est pourquoi on utilise plutôt la consommation cumulative pour trouver ce rapport. Il s'agit alors de calculer la masse totale de nutriment consommé à un temps donné en tenant compte de l'alimentation faite. Le rapport stœchiométrique entre le glucose et la glutamine a ainsi été déterminé en calculant la pente de la droite reliant les masses cumulatives consommées (0,17) (voir graphique ci-dessous). La solution d'alimentation unique était donc enfin définie.

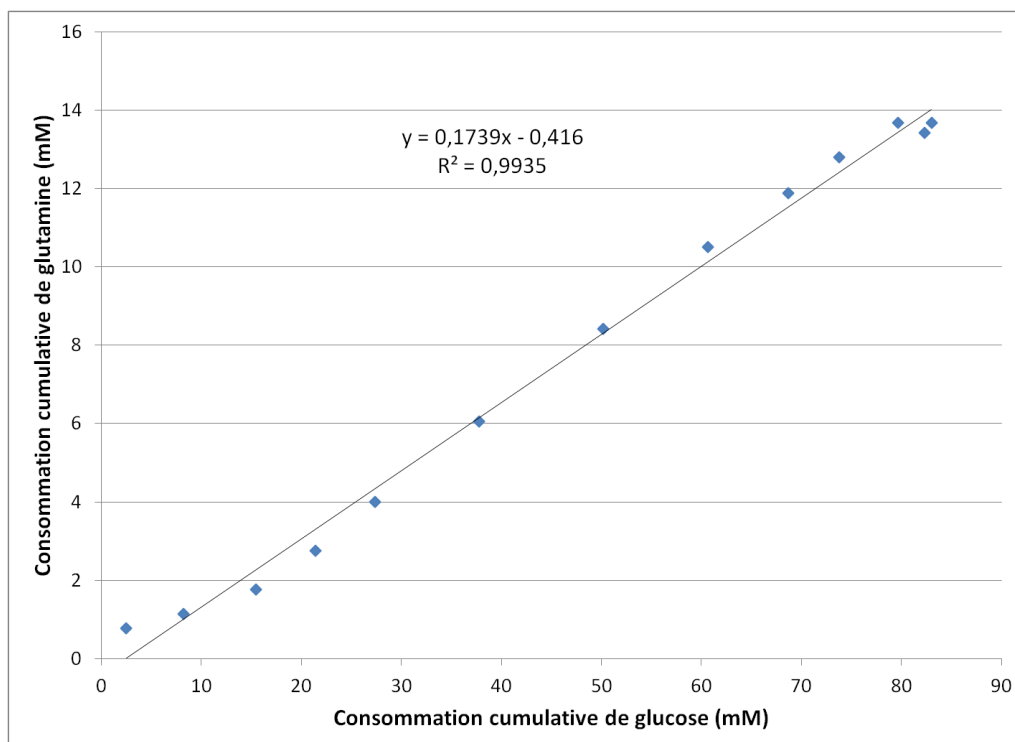


Figure 2.3 - Détermination du rapport stœchiométrique entre le glucose et la glutamine

## **CHAPITRE 3 EXPLOITING THE METABOLISM OF PYC EXPRESSING HEK293 CELLS IN FED-BATCH CULTURES**

### **3.1 Présentation de l'article**

Ce chapitre présente l'article *Exploiting the Metabolism of PYC Expressing HEK293 Cells in Fed-batch Cultures* soumis pour publication dans la revue Journal of Biotechnology. Dans ce manuscrit, il est démontré que des cellules HEK293 exprimant l'enzyme PYC2, de par le phénotype unique qu'elles présentent, constituent une plateforme particulièrement adaptée au mode de culture fed-batch employant des solutions d'ajout concentrées. En effet, une stratégie d'alimentation développée dans des cultures en flacons a permis d'améliorer la croissance de ces cellules. Lorsque transposé à la culture en bioréacteur et à l'aide d'une boucle de contrôle automatisée, le mode fed-batch s'est traduit par une augmentation encore plus significative de la croissance cellulaire et du rendement en produit. Le même protocole appliqué à la lignée parentale (sans PYC) a toutefois conduit à une accumulation importante de déchets métabolites ayant un effet néfaste sur la croissance et la productivité des cellules.

### **3.2 Auteurs**

Cédric Vallée<sup>1</sup>, Yves Durocher<sup>2</sup>, Olivier Henry<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Génie Chimique, École Polytechnique de Montréal,  
C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

<sup>2</sup>Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council, Canada

### 3.3 Abstract

The expression of recombinant yeast pyruvate carboxylase (PYC) in animal cell lines was shown in previous studies to reduce significantly the formation of waste metabolites, although it has translated into mixed results in terms of improved cellular growth and productivity. In this work, we demonstrate that the unique phenotype of PYC expressing cells can be exploited through the application of a fed-batch strategy and lead to significant process enhancements. Metabolically engineered HEK293 cells stably producing human recombinant INF $\alpha$ 2b and expressing the PYC enzyme were cultured in batch and fed-batch modes. In batch, when compared to parental cells, PYC expressing cells consumed less glucose and glutamine and there was no lactate accumulation at the end of the cultivation. The maximum cell density was increased 1.4-fold and the culture duration was extended by 2.5 days, but the product yield was however only marginally increased. A fed-batch protocol using a concentrated feed solution and relying on a simple control-loop to allow tight control of the glucose concentration was then implemented. The feeding strategy led to a further increase in cell density up to  $10.7 \times 10^6$  cells/ml and a final product titer of 160 mg/L, nearly a 4-fold increase compared to the batch process with the parental cell clone. In contrast, little benefit was observed when the same feeding strategy was applied on parental cells, as product titer decrease compare to the previous culture probably due to high lactate concentrations. These results demonstrate that the enhanced metabolism of PYC expressing cells can be taken advantage of to enhance product yields in fed-batch cultures. Moreover, the resulting lower final levels of waste metabolites can be expected to be also beneficial for product quality with respect to glycosylation patterns.

Keywords: HEK293 cells, pyruvate carboxylase, fed-batch, recombinant protein

### 3.4 Introduction

Cell culture process development aims at achieving high product titer and quality in a timely and cost-effective manner. Due to the low product yields and maximum cell densities typically reached in batch cultures, fed-batch and perfusion processes are the preferred modes for the manufacturing of recombinant proteins. Fed-batch processes are more widely used in industry due to their flexibility, ease of use and robustness compared to the more complex perfusion

cultures (Bibila and Robinson 1995). Increased growth and longer viability through optimize feeding strategy can lead to substantial product titer of over 10 g/L (Huang, Hu et al. 2010).

While nutrient limitations can be alleviated in fed-batch cultures, toxic metabolic by-products accumulation remains one of the major concerns in the design and application of any feeding protocol. Lactate and ammonia are well-known inhibitors of cell growth and productivity (Ozturk, Riley et al. 1992; Lao and Toth 1997; Cruz, Freitas et al. 2000). Moreover, waste metabolites can alter protein glycosylation patterns, thereby potentially affecting the quality of the recombinant product as well (Borys, Linzer et al. 1994; Andersen and Goochee 1995; Yang and Butler 2000). Hence, considerable efforts in the field of animal cell technology have been dedicated to reducing the accumulation of these waste metabolites in the culture environment.

Lactate and ammonia production can be reduced by controlling glutamine and glucose at low levels during a culture, as the cell metabolism will typically shift towards a more efficient nutrient utilization. This can be achieved provided that a dynamic feeding strategy is implemented to supply the appropriate amount of nutrients (Zhou, Rehm et al. 1997; Cruz, Moreira et al. 1999; Gambhir, Korke et al. 2003; Chee Fung Wong, Tin Kam Wong et al. 2005; Maranga and Goochee 2006). However, a complex monitoring and control scheme is needed since low but non-limiting residual concentrations must be maintained at all time. Moreover, low nutrient conditions can have adverse effects on product quality (Chee Fung Wong, Tin Kam Wong et al. 2005).

The use of chemically defined feeding solutions specifically designed to meet the cell metabolic needs provide another mean to improve fed-batch yields. This systematic approach, relying on spent media analysis and estimation of specific consumption rates, was successfully applied with various cell lines (Gorfien, Paul et al. 2003; Spens and Häggström 2007; Pacis, Vijayasankaran et al. 2010; Hu, Deng et al. 2011). Using statistical methods to screen for growth- and productivity-improving medium components can help accelerate this process (Hammett, Kuchibhatla et al. 2007; Jiang, Geng et al. 2012; Zhang, Wang et al. 2013). Most fed-batch processes rely on simple bolus feed delivered at fixed time intervals to maintain the concentration of a reference nutrient constant, usually based on some offline measurement (Wlaschin and Hu 2006). However, this leads to great variations in nutrient concentrations and is also often accompanied by an undesired increase in osmolarity. Therefore, a more strictly



controlled and continuous feeding strategy is preferable. Several dynamic feeding protocols based on online or quasi-online measurements have been developed and successfully applied to mammalian cell cultures (Wlaschin and Hu 2006). These feeding strategies can rely on the direct measurement of glucose/glutamine concentrations (Maranga and Goochee 2006; Lu, Toh et al. 2013), the oxygen uptake rate (Aehle, Schaepe et al. 2011; Gálvez, Lecina et al. 2012) and online biomass measurements (Lu, Toh et al. 2013). Recently, a simple control strategy was proposed to control glucose levels based on pH variations resulting from the production or consumption of lactate by CHO-K1 cells (Gagnon, Hiller et al. 2011).

Cellular engineering approaches can also be used to improve the cell metabolism by over-expressing or knocking-out certain genes. Glutamine-synthetase (GS) expression in hybridoma cells confer them the ability to grow in glutamate-based medium (Bell, Bebbington et al. 1995; Paredes, Prats et al. 1999), thereby effectively reducing ammonia production and improving the growth rate. In order to reduce the conversion of pyruvate to lactic acid, down-regulation/disruption of lactate dehydrogenase (LDH) has been attempted by antisense mRNA (Jeong, Kim et al. 2001), homologous recombination (Chen, Liu et al. 2001) and more recently by small interfering RNA (siRNA) (Kim and Lee 2007). In the latter case, LDH activity was reduced by 70-86% and lactate production by 45-79%. Concomitant with the decrease in lactic acid production, glucose consumption was decreased by 54-87% and this metabolic change did not impair cell growth or productivity. Finally, expression of cytosolic yeast pyruvate-carboxylase (PYC2) was shown to dramatically decrease waste metabolite formation in HEK293 (Elias, Carpentier et al. 2003; Henry and Durocher 2011), BHK21 (Irani, Wirth et al. 1999; Irani, Beccaria et al. 2002) and CHO (Fogolín, Wagner et al. 2004) cells, although these metabolic changes yielded mixed results with respect to cellular growth and/or productivity. However, to date, the unique phenotype of these transformed cells has not been explicitly exploited in the development and application of a fed-batch strategy.

In this work, we report on the use of concentrated feed solutions to enhance the growth and productivity of PYC expressing HEK293 cells. Small-scale optimization studies were initially performed in shake flasks to define a feeding protocol leading to increased cell growth. This constituted the basis for the establishment of a dynamic feeding strategy based on quasi-online glucose measurement that was applied in bioreactor. In the case of PYC expressing cells, it was shown that this strategy, in conjunction with the more controlled bioreactor conditions (e.g. pH

and pO<sub>2</sub>), resulted in further significant increases in terms of maximum cell density, culture longevity and final product titer. Oxygen uptake rate measurements were also carried out to highlight further potential differences between the metabolism of the transformed and parental cells.

## **3.5 Materials and Methods**

### **3.5.1 Cell lines**

The parental clone HEK293-IFN (293-D9) stably producing interferon- $\alpha 2\beta$  was generated from the HEK293-6E cell line constitutively expressing the EBNA1 protein from the Epstein-Barr virus as detailed by Loignon *et al.* (Loignon, Perret *et al.* 2008). The HEK293-IFN-PYC clone F5 (293-F5) was derived from the abovementioned parental clone by transfection of the cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase 2 gene (Elias, Carpentier *et al.* 2003) (GeneID: 852519). as described by Henry *et al.* (Henry and Durocher 2011).

### **3.5.2 Culture medium and feeding solution**

Freestyle F17 expression medium (Invitrogen Life Technology, USA) supplemented with 4 mM glutamine, 0.1% anti-clumping agent and 1% Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, USA) was used for all shake-flask experiments. For bioreactor experiments, the basal medium was also supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen Life Technology, USA). For the fed-batch cultures, CHO CD EfficientFeed™ B liquid nutrient supplement (Invitrogen Life Technology, USA) and concentrated glutamine (sigma) at 200 mM were employed.

### **3.5.3 Batch and fed-batch cell cultivation in shake flasks**

Batch experiments were carried out in duplicate 125 ml shake-flasks (Corning, USA) at a 20 ml initial working volume. Cultures were inoculated at a cell density of  $0.2 \times 10^6$  cells/ml and incubated at 37°C, under 5% CO<sub>2</sub> on an orbital shaker at 120 RPM. Samples were taken daily to measure the cell density and nutrient concentrations. For fed-batch cultures, once the analyses were completed, a 1 ml bolus addition of EfficientFeed was performed on a daily basis, whereas glutamine was fed separately to maintain a desired set point from day 2 onward.

### 3.5.4 Bioreactor cell cultivation

Batch cultures were performed using a 2L stirred bioreactor (Labfors 4 cell, Infors HT, Switzerland) with a working volume of 0.5L and inoculated at cell density of  $0.2 \times 10^6$  cells/ml. Stirring speed started at 80 RPM and was gradually increased throughout each run to reduce cell clumping, until a maximum of 120 RPM was reached. The temperature was maintained at 37°C with a water jacket and pH was controlled at 7.0 by carbon dioxide surface aeration and by sodium hydroxide addition. Dissolved oxygen tension (pO<sub>2</sub>) was kept at 40% of air saturation by surface aeration using a gas mixture of oxygen/nitrogen/air fed at 100 ml/min. When surface aeration was insufficient to maintain the desired set-point, pure oxygen was sparged at 2ml/min with an on/off controller to minimize foaming. Manual samples were taken twice a day. Fed-batch cultivations were carried out under the same operating conditions, with the addition of a control loop to adjust the feed rate as described below. Feeding of the bioreactor was initiated once the cell density reached  $1 \times 10^6$  cells/ml.

### 3.5.5 Feeding strategy for bioreactor

For fed-batch bioreactor cultures, a control loop based on at-line glucose concentration measurements was implemented so as to maintain this nutrient at a constant concentration. The control strategy was adapted from Dowd *et al.* (Dowd, Weber et al. 1999) and relies on a simple mass balance:

$$\frac{dm_{glc}}{dt} = \frac{C_{feed} V_{feed\ t}}{dt} + GUR \quad (1)$$

where,

$$\frac{dm_{glc}}{dt} \approx \frac{(C_t V_t - C_{t-1} V_{t-1})}{\Delta t} \quad (2)$$

$C_{feed}$  and  $C_t$  denote the glucose concentrations in the feed and in the bioreactor, respectively.  $V_t$  is the culture volume in the bioreactor and  $V_{feed\ t}$  represents the volume of feed added during the sampling interval. The glucose uptake rate (GUR) is the key parameter to be estimated in eq (1). Since GUR evaluation is based on a noisy measurement, smoother estimates were obtained by using an arithmetic moving average:

$$FGUR_t = FGUR_{t-1} + 1/N \cdot (GUR_t - GUR_{t-N}) \quad (3)$$

$FGUR_t$  and  $GUR_t$  represent respectively the filtered and unfiltered values, while  $N$  is the time period over which measurements are averaged. Although simple, this filter proved sufficient for the application described herein. Finally, the filtered measurement can be used to determine the next feed rate by solving:

$$C_{sp} V_{t+1} = C_{feed} V_{feed\ t+1} + C_t V_t + FGUR_t \cdot dt \quad (4)$$

Where  $C_{sp}$  is the desired set-point for the glucose concentration and  $V_{feed+1}$  is the volume of feed to be added in order to maintain this set-point. This simple and robust algorithm does not depend on any model or defined parameter and can therefore adapt easily to changes in the process dynamics. Bioreactor samples were automatically taken at 6-hour intervals, as this sampling frequency ensured a good control of the glucose concentration and did not cause instability of the controller. The samples were withdrawn from the bioreactor via a FISP cell-free sampling probe (Flownamics, USA) using an automatic sampling system FAISS 800 (Flownamics, USA) connected to a YSI2700 Select biochemistry analyzer (Yellow Spring Instrument, USA) allowing the measurement of glucose and lactate concentrations. Following each analysis, the sampling line was flushed with sodium hydroxide to prevent contamination. The control algorithm was implemented in MATLAB and the feed rate was automatically adjusted using a REGLO digital peristaltic pump (Ismatec, Germany).

### 3.5.6 Analytical techniques

Cell number and viability were assessed by trypan blue exclusion and counting on a hemocytometer. Samples were centrifuged and the supernatants were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis. The glucose, lactate, glutamine concentrations in supernatants were measured with a YSI 2700 Select biochemistry analyzer (Yellow Spring, USA). Ammonia concentration was measured by the VITROS chemistry DT6 0II system (Orthoclinical Diagnostics, USA). Interferon- $\alpha 2\beta$  titer was quantified using the VeriKine Human IFN- $\alpha$  ELISA kit (PBL Interferon source, USA) according to the manufacturer's instructions.

### 3.5.7 Oxygen uptake rate

Oxygen uptake rate (OUR) measurements were performed at regular intervals using the on-line dynamic method (Zhou and Hu 1994). At the time of analysis, nitrogen was sent to the bioreactor in order to flush out the oxygen and stirring speed was also reduced to limit desorption. The slow decrease in  $pO_2$  resulting from cellular respiration and oxygen desorption was monitored until 30% air saturation was reached. The OUR was then calculated from the following mass balance equation:

$$OUR = \frac{C_{O_2}(t_0) - C_{O_2}(t_f)}{t_f - t_0} - \frac{\int_{t_0}^{t_f} (K_{des} \cdot C_{O_2}(t)) dt}{t_f - t_0} \quad (5)$$

$C_{O_2}(t_0)$  and  $C_{O_2}(t_f)$  are the dissolved oxygen concentrations at the beginning and at the end of each measurement, respectively.  $K_{des}$  denotes the mass transfer coefficient and is used to account for the desorption of oxygen during the measurement.

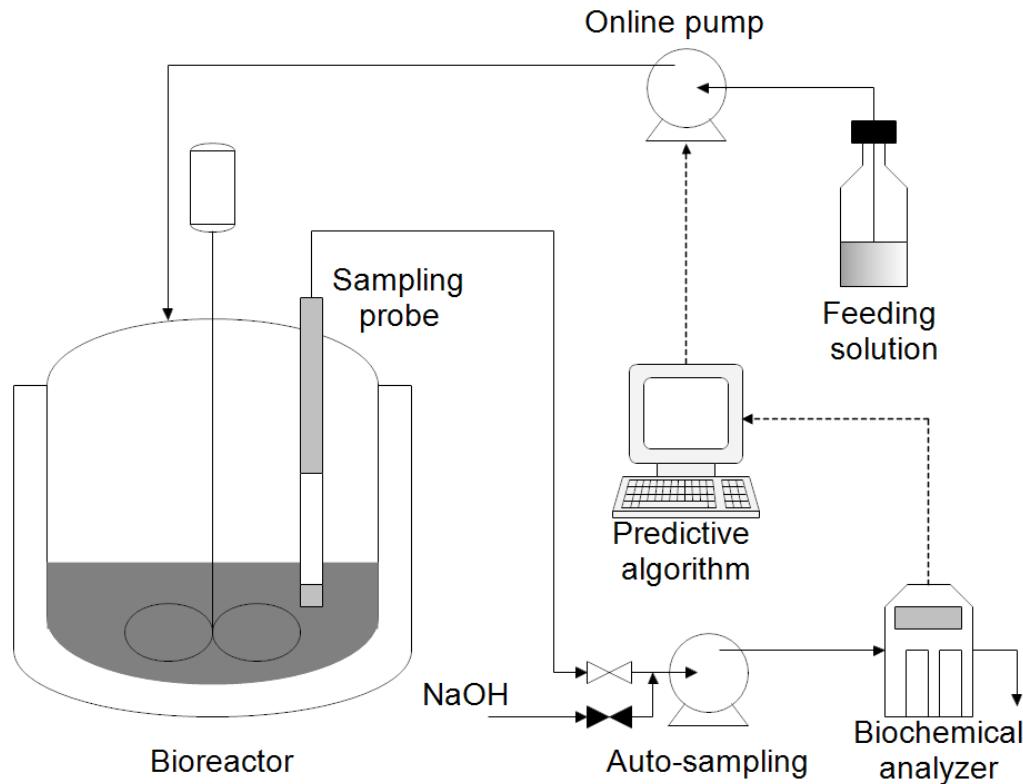


Figure 3.1 - Design of the automated feeding strategy

## 3.6 Results

### 3.6.1 Batch experiments in shake flasks

Batch shake flask cultures were conducted with both cell lines to serve as controls and highlight the main differences between the parental (293-D9) and PYC expressing (293-F5) cells. The maximum cell density of  $7.5 \times 10^6$  cells/ml achieved with the 293-F5 clone was over 2-fold higher as compared to parental cells (Figure 3.2A). This significant improvement was due to the combined effect of a slightly enhanced growth rate ( $0.030 \text{ h}^{-1}$  vs  $0.026 \text{ h}^{-1}$ ) and an increased duration of the exponential growth phase. However, cell viability was maintained for a longer period of time in the case of 293-D9 cells, as PYC expressing cells exhibited a sharp increase in death rate. Nevertheless, the integral of viable cells (IVC) for the 293-F5 clone was 85% higher over the length of the batch experiments. While glucose and glutamine concentration profiles were relatively similar for both cell clones, expression of the PYC2 gene led to a reduction in the maximum lactate concentration from 20mM to 13mM (Figure 3.2D), and, as a result, to a higher final culture pH (7.5 vs 7.3 for the 293-F5 and 293-D9 cells, respectively). A comparison of the cell specific consumption and production rates evaluated during the exponential growth phase is presented in Table 3.1. The concomitant decrease in lactate production rate, glucose consumption rate and lactate-to-glucose ratio led to the significant decrease in waste metabolite level observed for the 293-F5 cells. During the mid-exponential phase, these cells underwent a switch to lactate consumption, which also contributed to the marked reduction in lactate concentration. In fact, nearly all the available lactate was consumed by the end of the culture. For the 293-D9 cells, the metabolic shift towards lactate consumption occurred later and was not as pronounced as in the case of the 293-F5 clone. Interestingly, expression of the PYC2 gene also greatly impacted the glutamine specific consumption rate, indicating an intricate relationship between glucose and glutamine metabolisms. Such reduced glutamine consumption is expected to decrease the accumulation of ammonia and thus to favour cell growth, as was demonstrated in the bioreactor experiments (discussed below). All these profound physiological changes did not however translate into product yield. The final recombinant interferon titer for 293-F5 cells was actually 2-fold lower than for the parental clone (30 vs 60 mg/L). This was mainly due to a significant drop of the specific productivity from 3.2-3.6 pg/cell.d for the parental cells to 0.7-1.0 pg/cell.d

for the PYC expressing cells and suggesting that enhanced growth might be at the expense of cell specific productivity (and conversely).

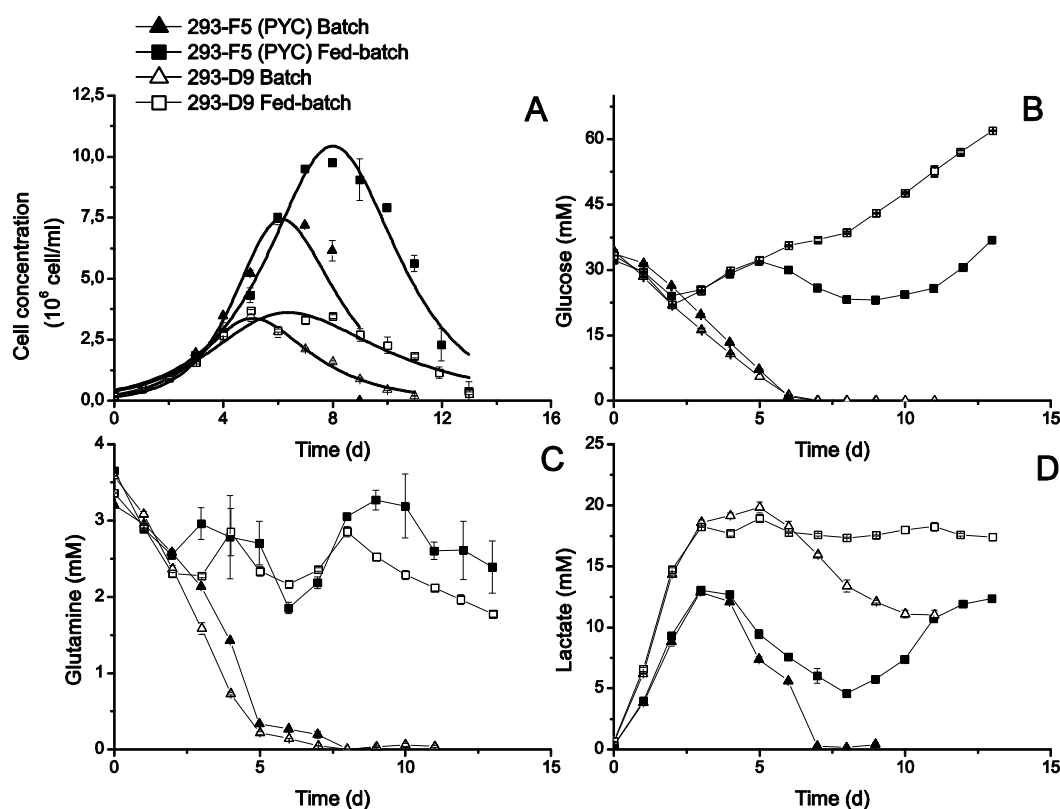


Figure 3.2 - Viable cell (A), glucose (B), glutamine (C) and lactate (D) concentrations profiles during batch and fed-batch cultivation of 293-D9 and 293-F5 cells in shake flasks

### 3.6.2 Fed-batch experiments in shake flask

In order to avoid the early nutrient limitations encountered in batch and improve cell growth and productivity, fed-batch cultures were performed by feeding concentrated nutrient solutions on a daily basis. As depicted on Figure 3.2A, only little improvement was made when going from batch to fed-batch cultures for the parental clone. The maximum cell density was similar ( $3.7 \times 10^6$  cell/ml) and the growth rate was even slightly reduced ( $0.022 \text{ h}^{-1}$ ), but culture longevity was nonetheless extended by 2 days, as reflected in the IVC which was nearly 2-fold higher than in the control batch culture. For the 293-F5 clone, the growth rate was similar ( $0.029 \text{ h}^{-1}$ ), but the

growth phase was extended by 24 hours and the culture achieved a maximum cell density of nearly  $10 \times 10^6$  cells. The cell specific death rate during the decline phase was also reduced due to the increased nutrient availability and, overall, the IVC was increased 2.6-fold compared to the batch experiment. The feeding regime ensured that glutamine and glucose remained at non limiting levels throughout the fed-batch cultures. Lactate concentration profiles were mostly similar to batch experiments for both cell lines, except that the 293-D9 cells did not switch to a lactate consumption state, most likely because there was no carbon limitation. The final pH of the two cell lines were similar and considerably lower than in batch mode ( $\sim 6.2$ ), indicating that the acidic concentrated feed solutions added might have contributed more to the acidification of the culture medium than waste metabolite accumulation. For both cell clones, glucose and lactate production/uptake rates were not significantly different between batch and fed-batch cultures. However, the glutamine uptake rate of PYC expressing cells increased by almost 2-fold and was comparable to the consumption rate of the parental cells. In fed-batch mode, product titers were improved for both cell lines; the 293-D9 and 293-F5 clones yielded 80 and 95 mg/L of recombinant interferon, respectively. While the cell specific production rate of 293-D9 cells remained comparable to batch (1.1-fold increase), PYC expressing cells exhibited a 2-fold increase in productivity resulting from the nutrient additions.

Table 3.1 - Impact of recombinant PYC2 expression on metabolic rates in shake flasks

Parameters	Batch			Fed-batch		
	D9	F5 clones	Improvement factor	D9	F5 clones	Improvement factor
$q_{\text{glucose}}$ (pmol/cell d)	[8.0-8.2]	[6.4-6.6]	[1.2-1.3]	[7.5-7.8]	[6.6-6.9]	[1.1-1.2]
$q_{\text{lactate}}$ (pmol/cell d)	[7.1-7.2]	[4.9-5.1]	[1.4-1.5]	[7.4-7.6]	[5.2-5.3]	[1.4-1.5]
$q_{\text{glutamine}}$ (pmol/cell d)	0.9	[0.4-0.5]	[1.6-1.9]	0.9	0.8	1.2
lactate/glucose ratio	0.9	0.8	1.1	1.0	0.8	1.3
$q_{\text{interferon}}$ (pg/cell d)	[3.2-3.6]	[0.7-1.0]	[0.2-0.3]	3.9	[1.6-2.1]	[0.4-0.6]

### 3.6.3 Batch experiments in bioreactors

In order to investigate whether the enhanced metabolism of PYC expressing cells could further benefit from controlled environmental conditions, cells were grown in fully instrumented 2L-bioreactors. Overall, the main cell kinetics in bioreactor were consistent with the ones observed in shake flasks. The maximum cell density achieved by 293-F5 cells ( $5.1 \times 10^6$  cells/ml) was 1.5-



fold greater than that of the parental clone (Figure 3.3). This can be attributed mainly to a prolonged exponential phase, as the maximum growth rates were found to be quite similar ( $0.028\text{h}^{-1}$  and  $0.030\text{h}^{-1}$  for 293-D9 and 293-F5 respectively). The controlled environment was particularly beneficial for the PYC expressing cells, as they could maintain a high viability much longer after the peak in cell density, strongly suggesting that the sharp decline phase observed in shake-flask cultures might have been related to a previously uncontrolled parameter such as pH or dissolved oxygen. Since the death rate was similar for both cell lines, the greater culture longevity of 293-F5 cells led to a 90 % increase in cumulative viable cell concentration, which is consistent with the shake flask experiments results. The glucose, lactate, glutamine and ammonia time profiles of the batch cultures are presented in Figure 3.3. For the most part, trends were similar to the ones observed in shake-flask experiments. Differences in the lactate profile were even accentuated, with a maximum concentration of 34mM for parental cells and only 13mM for the 293-F5 clone. This variation was clearly reflected in the pH control loop; while a certain amount of base solution was added in the 293-D9 culture to maintain the pH at its set-point, none was required in the case of PYC expressing cells. It is quite evident from Figures 3B and 3C that 293-F5 cells exhibited reduced glucose and glutamine consumption rates, as the depletion of nutrients occurred more rapidly in the 293-D9 culture even though the cell density was lower. As shown in Table 3.2, the glucose specific uptake rate was decreased by 2-fold in PYC expressing cells and lactate production was reduced even more significantly (4-fold). Hence, the lactate-to-glucose ratio of 293-F5 cells dropped to a mere 0.6, a 2-fold reduction compared to the parental clone. This ratio was also much lower than values commonly reported for cultivated mammalian cells under excess glucose conditions (typically between 1.5 and 2). Similar to glucose, glutamine utilization by 293-F5 cells was also significantly reduced. In line with this observation, the final ammonia concentration was much higher for the parental clone, as they exhibited a specific production rate that was 3 times greater. In agreement with the small-scale experiments, the PYC clone displayed a lower interferon specific production rate, and, as a result, no increase in final product titer was achieved (57 vs 61 mg/L for the 293-D9 and 293-F5 cells, respectively), despite the significant growth improvement. From Figure 3.3F, it appears that much of the interferon production occurred after the exponential growth phase.

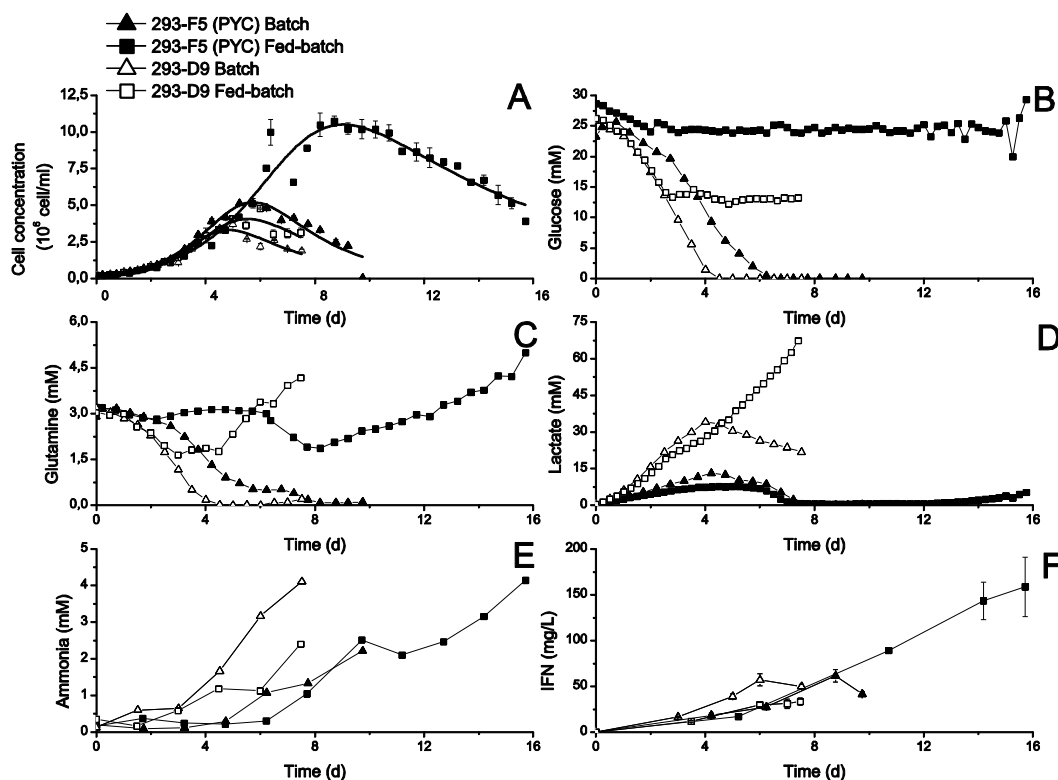


Figure 3.3 - Viable cell (A), glucose (B), glutamine (C), lactate (D), ammonia (E) and interferon (F) concentrations profiles during batch and fed-batch cultivation of 293-D9 and 293-F5 cells in bioreactors

### 3.6.4 Fed-batch experiments in bioreactors

Table 3.2 - Impact of recombinant PYC2 expression on metabolic rates in bioreactors

Parameters	Batch			Fed-batch		
	D9	F5 clones	Improvement factor	D9	F5 clones	Improvement factor
$q_{\text{glucose}}$ (pmol/cell d)	6.3	3.3	1.9	4.8	3.6	1.3
$q_{\text{lactate}}$ (pmol/cell d)	8.3	2.0	4.2	5.1	1.5	3.4
$q_{\text{glutamine}}$ (pmol/cell d)	0.8	0.4	2.0	0.8	0.5	1.6
$q_{\text{ammonia}}$ (pmol/cell d)	0.3	0.1	3.0	0.2	0.1	2.0
lactate/glucose ratio	1.3	0.6	2.2	1.1	0.4	2.8
ammonia/glutamine ratio	0.4	0.3	1.3	0.3	0.2	1.5
$q_{\text{interferon}}$ (pg/cell d)	5.5	2.7	0.5	2.4	2.4	1.0

A simple control loop was added to the bioreactor to assess the effects of a dynamic feeding strategy on the growth/productivity of the two cell clones. As shown on Figure 3.3B, the glucose concentration was successfully kept close to the desired set-point in both fed-batch cultures. To maintain their respective set-points, the cells expressing recombinant PYC required an average feed of 37 mL/d, while the parental clone required 50 mL/d. For the PYC clone, the dynamic feeding strategy led to drastic improvements in terms of both cellular growth (Figure 3.3A) and product titer (Figure 3.3F). The feed was able to extend the growth phase of the 293-F5 by one day and did not alter the cell specific growth rate ( $0.029\text{h}^{-1}$ ). A maximum cell density of  $10.7 \times 10^6 \text{ cells/mL}$  was reached, representing a 2-fold increase over the corresponding batch mode. The fed-batch mode also reduced the specific death rate of the cell during the decline phase, which resulted in a 4-fold increase in the IVC over the batch culture. In contrast, the feeding strategy had limited impact on the parental clone growth. The duration of the culture and the cell specific growth rate remained similar, and only a little increase in maximum cell density (30%) was attained. These results suggest that for the 293-D9 clone, cell growth was likely not limited by nutrient depletion, but rather inhibited either by the accumulation of ammonia or the increased osmolarity caused by the pH control. Indeed, on a daily basis, twice as much alkali solution was necessary for the fed-batch culture with the parental clone. In contrast, the lactate concentration profiles for the PYC expressing cells were nearly identical for both culture modes. When going from batch to fed-batch, the specific nutrient uptake and metabolite production rates were found to decrease or to remain constant for both cell lines (Table 3.2). However, similar improvement between the clones regarding the specific rates was observed in fed-batch. Ammonia levels remained at a lower concentration for the parental clone (2.4mM) than for the PYC expressing cells (4.1mM). Nonetheless, the specific production rate of ammonia was smaller for the PYC expressing cells. Parental cells and PYC expressing cells exhibit an identical interferon specific production in this culture mode (Table 3.2). More importantly, the PYC expressing cells maintained their increased nutrient utilization efficiency. Although final ammonia levels were lower for the parental clone (2.4 mM) than for the PYC expressing cells (4.1 mM), the latter nonetheless exhibited a smaller cell specific production rate of this metabolite due to the increase in both cell density and culture longevity. Interestingly, parental and PYC expressing cells had almost identical cell specific interferon production rates in fed-batch cultures (Table 3.2). As shown in Figure 4, this translated into a 2.6-fold increase in

product titer for the 293-F5 cells when compared to the batch mode, reaching up to 160 mg/L. In contrast, for the parental clone, the fed-batch strategy resulted in a reduction of the final interferon concentration. This decreased was most probably caused by the high lactate concentration (>70 mM) that generated unfavorable production conditions.

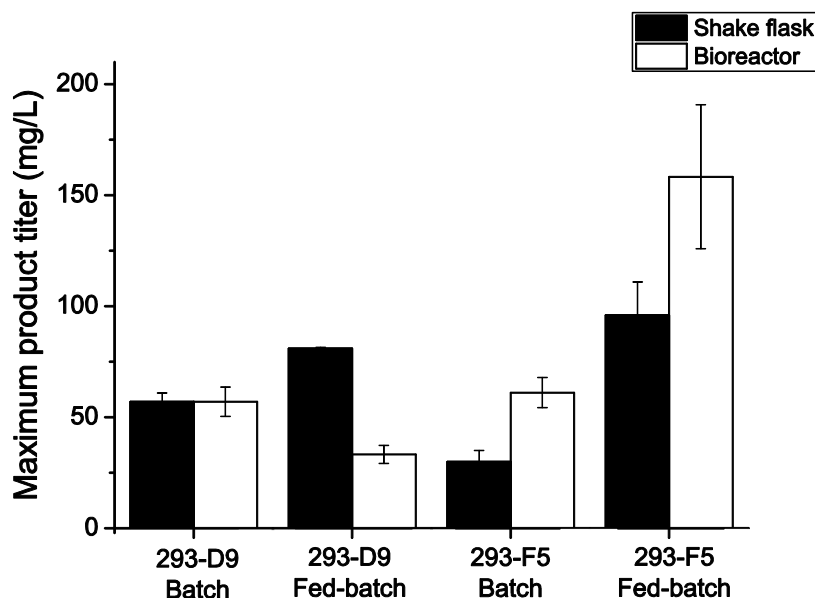


Figure 3.4 - Comparison of maximum interferon titer between 293-D9 and 293-F5 cells during batch and fed-batch cultivation in bioreactors and shake flasks

### 3.6.5 Oxygen uptake rate

Oxygen uptake rate was routinely measured during all bioreactor experiments to determine whether the specific oxygen uptake rate ( $q_{O_2}$ ) was significantly different between the two clones and under the different operating modes. From the results shown on Figure 5, it can be seen that, considering the experimental errors involved, there is no detectable effect of the PYC gene expression on the respiration rate. The small decreases noted when going from batch to fed-batch were most likely due to the impact of feeding (i.e. increase in culture volume) on the oxygen mass transfer coefficient (assumed constant), causing a slight underestimation.

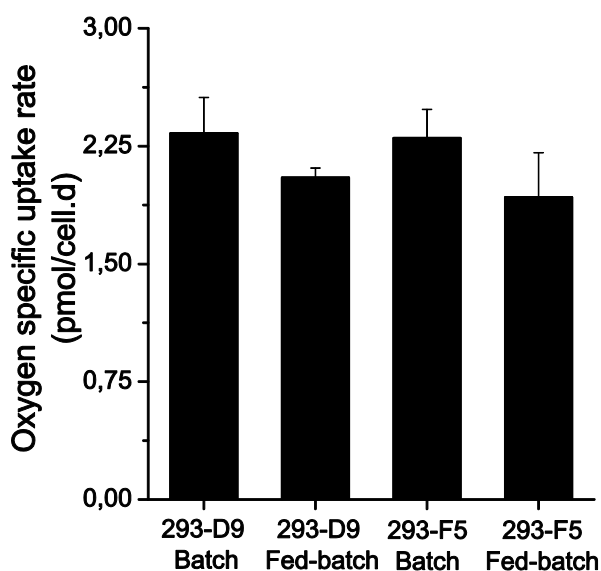


Figure 3.5 - Comparison of specific oxygen consumption rate between 293-D9 and 293-F5 cells during batch and fed-batch cultivation in bioreactors

### 3.7 Discussion

Under excess glucose and glutamine conditions, mammalian cells in culture typically exhibit high rates of nutrient consumption resulting in high ammonia and lactate production (the so called “overflow metabolism”). In batch mode, HEK293 cells modified to express the PYC2 gene display a much more efficient metabolism, characterized by lower glucose and glutamine consumption rates and reduced ammonia and lactate formation. This was demonstrated both in the current and a prior study (Henry and Durocher 2011) conducted using a different medium formulation. Such improved metabolic efficiency is usually achieved following cell exposure to low nutrient conditions, but we have shown in our study that PYC expressing cells retain their unique phenotype even under high glucose and glutamine levels in a fed-batch process. In fact, the nutrients were most efficiently consumed under fed-batch conditions. In contrast with the parental clone, maintaining non-limiting nutrient conditions by feeding the culture allowed to increase the duration of the exponential growth phase and to extend culture longevity, all leading to significant improvement in the product volumetric yield. The lower lactate production of PYC expressing cells reduces the acidification of the medium, in turn minimizing the impact of extracellular osmolarity changes resulting from the addition of base solution to control the pH.

This prevented or delayed inhibitory effects on cellular growth and productivity, while such effects were likely detrimental in the case of parental cells cultures. However, while the maximum cell specific growth rate remained largely unaffected by PYC expression, we observed an apparent decrease in the specific productivity of the cells. This appears to be in contradiction with our previous study (Henry and Durocher 2011) where the specific productivity was not impaired by the metabolic changes. However, it should be emphasized that the cultures performed in the present study achieved far greater cell densities and culture durations were also significantly longer. Taken together, results from our shake flasks and bioreactor cultures tend to suggest that cell growth improvement may often be at the expense of cellular productivity. To improve the product yield, the cumulative viable cell concentration must thus sufficiently be enhanced so as to offset the reduction in recombinant protein expression rate, as was the case for the fed-batch culture.

In contrast with our results, a 2-fold increase in specific productivity was observed in PYC transfected BHK-21 cells expressing recombinant EPO in batch mode (Irani, Beccaria et al. 2002), while no effects were observed on the maximum cell density and growth rate. However, in a perfusion mode, the maximum cell density increased by more than 2.5-fold and the cell specific growth rate was also enhanced (Irani, Wirth et al. 1999). Similarly, PYC2 expression in CHO cells also improved the specific productivity by 2-fold in batch mode (Fogolín, Wagner et al. 2004). While the growth rate and maximum cell density were both reduced, cell viability was maintained for a longer period and this ultimately led to a higher final product titer. In batch cultivation of HEK293 cells also transfected with the PYC2 gene, a marked reduction of lactate and ammonia production helped increase cell viability, but no significant effects were reported on the SEAP titer and the specific growth rate (Elias, Carpentier et al. 2003). Taken together, these results along with ours suggest that the effects of this enzyme still remain largely dependent on the cell type and the prevailing culture conditions.

Although PYC expressing cells already exhibit better growth characteristics than the parental cells in batch mode, their advantageous phenotype shows the most potential for improvement in long term non-limiting nutrient conditions. The dynamic feeding strategy used in this study was thus designed to take full advantage of the cells efficient metabolism and was clearly suboptimal for parental cells, given that the product volumetric yield was actually less than in batch cultures.

The scale-up from uninstrumented shake-flasks to bioreactor cultures with more controlled environmental conditions also provided some interesting insights. For the 293-F5 clone, the metabolism and growth remained mostly similar when going from small-scale to bioreactor. However, the product titer and specific productivity increased substantially both in batch and fed-batch cultures. The controlled pH undoubtedly played a role in that increase, as medium acidification can be detrimental to the product and the cells (Ozturk, Riley et al. 1992; Lao and Toth 1997; Cruz, Freitas et al. 2000). It was recently reported that bolus feed can be suboptimal when compared to dynamic feeding strategies, because of the sudden effect on osmolarity (Lu, Toh et al. 2013). The application of a more gradual feed might also have had some effect on the product yield. In the case of the 293-D9 parental cells, the bioreactor experiments were characterized by significantly higher lactate concentrations when compared to the corresponding shake flask cultures. The difference was more pronounced in fed-batch mode, since glucose was controlled at a high concentration and this is known to drive metabolic fluxes toward high lactate production. In shake flask cultures, lactate production stopped prior to glucose exhaustion, suggesting that there might be an inhibition effect caused by a decrease in pH. This hypothesis is supported by the apparent lack of such inhibition in the bioreactor cultures (i.e. controlled pH), which reached much higher lactate levels when compared to flask experiments.

The oxygen uptake rate is often regarded as an important physiological indicator of mammalian cell metabolism. Previous studies on PYC expression in BHK-21 cells have reported an increased flux from glucose carbon to CO<sub>2</sub> coupled with a concomitant increase in the intracellular ATP pool, all pointing to an enhanced TCA activity (Irani, Wirth et al. 1999). It has been speculated that the benefit of PYC overexpression is due to the increased competition for pyruvate between this enzyme and lactate dehydrogenase, thereby effectively reducing the lactate production (Fogolín, Wagner et al. 2004). However, cell specific oxygen uptake measurements performed in our study revealed no detectable difference between PYC expressing and parental cells. A <sup>13</sup>C metabolic flux analysis previously conducted on 293-F5 cells confirmed an increase in the pyruvate flux to oxaloacetate (Henry and Durocher 2011), but once the latter is converted to malate, it can either enter the TCA cycle for complete oxidation or be recycled into pyruvate via *cytosolic* malic enzyme. Hence, more work is needed to elucidate the regulating mechanisms behind the increased metabolic efficiency of these cells.

The 293-F5 cells have been shown previously to yield highly glycosylated and fully active interferon- $\alpha 2\beta$  in batch using the same culture medium (Loignon, Perret et al. 2008). However, there is now ample evidence in the literature that glycosylation patterns can be negatively altered by elevated waste product accumulation, and this is more likely to occur in conventional high cell density fed-batch cultures. In that context, the lower waste metabolite formation by PYC expressing cells, as well as the reduced requirements for base addition, could be expected to enhance final product quality and stability in the culture medium. However, the potential beneficial effects of the PYC2 gene expression on product quality have yet to be demonstrated.

### **3.8 Conclusions**

We have shown that HEK293 cells metabolically engineered to express a recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase enzyme constitute an interesting production platform that is particularly well-suited for fed-batch applications. A dynamic feeding strategy based on a simple control loop was able to substantially increase culture growth and longevity and translated into significant improvement of the product yield. The PYC expressing cells were shown to be robust by retaining their efficient metabolism in all the culture modes and process conditions investigated. The feeding strategy employed in this study was developed for maximizing the cumulative viable cell concentration. As cell growth seems to hinder the cell specific productivity, further improvement could potentially be achieved by screening for medium additives or process conditions stimulating productivity (e.g. mild hypothermia conditions).

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank the following persons: Cecile Toussaint (CNRC) for performing ammonia analysis and Prof. Mario Jolicoeur (Canadian Research Chair on the development of metabolic engineering tools) for granting access to the bioreactors employed in this study



## References

- Aehle, M., Schaepe, S., Kuprijanov, A., Simutis, R., Lubbert, A., (2011) Simple and efficient control of CHO cell cultures. *Journal of Biotechnology* 153, 56-61.
- Andersen, D.C., Goochee, C.F., (1995) The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 47, 96-105.
- Bell, S.L., Bebbington, C., Scott, M.F., Wardell, J.N., Spier, R.E., Bushell, M.E., Sanders, P.G., (1995) Genetic engineering of hybridoma glutamine metabolism. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 98-106.
- Bibila, T.A., Robinson, D.K., (1995) In Pursuit of the Optimal Fed-Batch Process for Monoclonal Antibody Production. *Biotechnol. Prog.* 11, 1-13.
- Borys, M.C., Linzer, D.I.H., Papoutsakis, E.T., (1994) Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner. *Biotechnology and Bioengineering* 43, 505-514.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., Gek Sim Yap, M., (2005) Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 89, 164-177.
- Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P.A., Wang, D.I., (2001) Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng* 72, 55-61.
- Cruz, H.J., Freitas, C.M., Alves, P.M., Moreira, J.L., Carrondo, M.J.T., (2000) Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 43-52.
- Cruz, H.J., Moreira, J.L., Carrondo, M.J.T., (1999) Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotechnology and Bioengineering* 66, 104-113.
- Dowd, J.E., Weber, I., Rodriguez, B., Piret, J.M., Kwok, K.E., (1999) Predictive control of hollow-fiber bioreactors for the production of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering* 63, 484-492.

- Elias, C.B., Carpentier, E., Durocher, Y., Bisson, L., Wagner, R., Kamen, A., (2003) Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. 1 ed. American Chemical Society, pp. 90-97.
- Fogolín, M.B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., (2004) Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of Biotechnology* 109, 179-191.
- Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y.-T., Kittredge, A., DeFelice, J., Drapeau, D., (2011) High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 108, 1328-1337.
- Gálvez, J., Lecina, M., Solà, C., Cairó, J.J., Gòdia, F., (2012) Optimization of HEK-293S cell cultures for the production of adenoviral vectors in bioreactors using on-line OUR measurements. *Journal of Biotechnology* 157, 214-222.
- Gambhir, A., Korke, R., Lee, J.C., Fu, P.C., Europa, A., Hu, W.S., (2003) Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95, 317-327.
- Gorfien, S.F., Paul, W., Judd, D., Tescione, L., Jayme, D.W., (2003) Optimized nutrient additives for fed-batch cultures. *Biopharm International* 16, 34-40.
- Hammett, K., Kuchibhatla, J., Hunt, C., Holdread, S., Brooks, J., (2007) Developing Chemically Defined Media Through DOE: Complete Optimization with Increased Protein Production in Less than 8 Months. In: Smith, R. (Ed.), *Cell Technology for Cell Products*. Springer Netherlands, pp. 683-691.
- Henry, O., Durocher, Y., (2011) Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metabolic Engineering* 13, 499-507.
- Hu, S., Deng, L., Wang, H., Zhuang, Y., Chu, J., Zhang, S., Li, Z., Guo, M., (2011) Bioprocess development for the production of mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor vIII antibody C12 by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology* 63, 247-258.

- Huang, Y.M., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-Makagiansar, H., Ryll, T., (2010) Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol Prog* 26, 1400-1410.
- Irani, N., Beccaria, A.J., Wagner, R., (2002) Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells. *Journal of Biotechnology* 93, 269-282.
- Irani, N., Wirth, M., Van Den Heuvel, J., Wagner, R., (1999) Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 66, 238-246.
- Jeong, D.-w., Kim, T.S., Lee, J.W., Kim, K.T., Kim, H.J., Kim, I.-H., Kim, I.Y., (2001) Blocking of Acidosis-Mediated Apoptosis by a Reduction of Lactate Dehydrogenase Activity through Antisense mRNA Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 1141-1149.
- Jiang, K.D., Geng, Z., Casnocha, S., Xiao, Z., Gorfien, S., Jacobia, S.J., (2012) Fed-Batch Cell Culture Process Optimization. *BioProcess International* 10, 40-45.
- Kim, S., Lee, G., (2007) Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 152-159.
- Lao, M.S., Toth, D., (1997) Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol. Prog.* 13, 688-691.
- Loignon, M., Perret, S., Kelly, J., Boulais, D., Cass, B., Bisson, L., Afkhamizarreh, F., Durocher, Y., (2008) Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN $\alpha$ 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol* 8, 65.
- Lu, F., Toh, P.C., Burnett, I., Li, F., Hudson, T., Amanullah, A., Li, J., (2013) Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 191-205.
- Maranga, L., Goochee, C.F., (2006) Metabolism of PER.C6 cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. *Biotechnology and Bioengineering* 94, 139-150.

- Ozturk, S.S., Riley, M.R., Palsson, B.O., (1992) Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol Bioeng* 39, 418-431.
- Pacis, E., Vijayasankaran, N., Li, J., Gawlitzek, M., Amanullah, A., Li, F., (2010) Systematic Approaches to Develop Chemically Defined Cell Culture Feed Media. *Biopharm International* 23, 22-24,26-28,30,32.
- Paredes, C., Prats, E., Cairó, J.J., Azorín, F., Cornudella, L., Gòdia, F., (1999) Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. *Cytotechnology* 30, 85-93.
- Spens, E., Häggström, L., (2007) Defined protein and animal component-free NS0 fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering* 98, 1183-1194.
- Wlaschin, K.F., Hu, W.S., (2006) Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding. In: Hu, W.S., Scheper, T. (Eds.), *Cell Culture Engineering*. Springer, New York, pp. 43-74.
- Yang, M., Butler, M., (2000) Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering* 68, 370-380.
- Zhang, H.F., Wang, H.B., Liu, M., Zhang, T., Zhang, J., Wang, X.J., Xiang, W.S., (2013) Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. *Cytotechnology* 65, 363-378.
- Zhou, W., Hu, W.S., (1994) On-line characterization of a hybridoma cell culture process. *Biotechnol Bioeng* 44, 170-177.
- Zhou, W.C., Rehm, J., Europa, A., Hu, W.S., (1997) Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding. *Cytotechnology* 24, 99-108.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était d'optimiser la croissance et la productivité de cellules modifiées génétiquement de façon à rendre leur métabolisme primaire plus efficace et pour produire une glycoprotéine d'intérêt. Cette partie présente une discussion générale sur les résultats de l'ensemble des expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire.

Tel que rapporté pour d'autres lignées cellulaires, la surexpression de la pyruvate carboxylase conduit à des effets notoires sur le métabolisme des cellules HEK293. En effet, elles produisent une quantité inférieure de métabolites néfastes et consomment une plus petite quantité de glucose et de glutamine. Plus encore, elles présentent des ratios glucose/lac et glutamine/ammoniac fortement réduits. Henry *et al.* (Henry and Durocher 2011) avaient fait les mêmes observations pour ces cellules en les cultivant dans un milieu différent de celui utilisé dans le cadre de cette étude. Leur métabolisme peut donc être jugé plus efficace, puisque la croissance cellulaire n'est pas affectée alors que les cellules consomment une plus petite quantité de nutriments. Ces résultats pourraient suggérer une utilisation des voies métaboliques plus favorables à la production d'énergie. De plus, les traits métaboliques observés sont stables même avec une exposition prolongée à de hauts niveaux de glucose et de glutamine dans l'environnement extracellulaire. Pour les cellules animales en culture, ces conditions sont normalement reconnues pour engendrer une utilisation sous-optimale des nutriments et une surproduction de déchets métaboliques (Lim, Wong et al. 2010).

La stratégie fed-batch développée dans le cadre de ces travaux a réussi à tirer profit de ce métabolisme avantageux. En effet, la phase de croissance a été prolongée par rapport à la culture batch. Il est probable que la production réduite d'ammoniac et de lactate ait permis de maintenir des conditions de pH et d'osmolarité favorables à la prolifération cellulaire plus longtemps. Par contre, pour les cellules parentales, la même stratégie n'a pas eu un impact aussi significatif, ce qui indique que dans le cas de ces cellules l'arrêt de la croissance n'était probablement pas simplement induit par l'épuisement des nutriments présents dans le milieu, mais probablement par la présence de déchets métabolique à des concentrations inhibitrices (Ozturk, Riley et al. 1992; Lao and Toth 1997; Cruz, Freitas et al. 2000).

La robustesse du comportement des cellules 293-F5 a aussi été démontrée lors du développement de la solution d'alimentation. En effet, la longévité des cultures et/ou la

croissance cellulaire ont été améliorés avec presque tous les types d'alimentation testés. Le métabolisme de ces cellules transformées s'avère donc particulièrement adapté aux stratégies fed-batch. Il a été montré qu'une solution contenant seulement un nutriment (du glucose) ou un groupe de nutriments était suffisante pour que des améliorations notoires soient visibles. Ce résultat contraste avec le comportement des cellules 293-D9 qui n'ont pas bénéficié de cette stratégie, même lorsque l'ensemble des paramètres étaient strictement contrôlés en bioréacteur et que la solution d'alimentation était plus complexe.

Cette étude a mis en lumière que les cellules exprimant le gène de levure présentent une diminution de la productivité spécifique qui n'a pas été observée avec la même ampleur dans une étude conduite avec le même système cellulaire (Henry and Durocher 2011). Cependant, une des différences majeures entre les deux études réside au niveau de la croissance des cellules. Dans les présents travaux, la quantité maximale de cellules observées dans les cultures s'avère nettement supérieure. Ces résultats portent à croire qu'il pourrait exister une relation inverse entre la croissance et la production de protéines recombinantes, la cellule en croissance utilisant la majorité de ses ressources (énergie, précurseurs, etc) disponibles pour se multiplier. Dans les cellules CHO, il a été couramment rapporté que maintenir un taux de croissance inférieur par le biais de conditions légèrement hypothermiques permet d'augmenter considérablement la production spécifique (Yoon, Choi et al. 2005; Trummer, Fauland et al. 2006; Kim and Lee 2007). Dans un même ordre d'idée, il a été inféré qu'une relation négative liait la production spécifique et le taux de croissance pour des cellules hybridomes produisant un anticorps (Zhang, Shen et al. 2004). Par contre, pour d'autres types de cellules exprimant la PYC, les résultats sont parfois différents. Pour des cellules BHK-21 en culture batch (Irani, Beccaria et al. 2002), la productivité spécifique a doublé par rapport aux cellules non transformées, alors qu'aucun effet n'a été observé au niveau de la densité cellulaire maximale. En mode perfusion, la densité maximale a augmenté d'un facteur de 2,5 fois par rapport aux cellules parentales (Irani, Wirth et al. 1999). Pour les cellules CHO en mode batch (Fogolín, Wagner et al. 2004), la productivité spécifique a aussi doublé en exprimant la PYC, par contre un plus faible taux de croissance a été observé. Enfin, pour des HEK293 (Elias, Carpentier et al. 2003), l'introduction du gène en mode batch n'a eu aucun effet significatif sur la productivité spécifique de SEAP, mais a permis de prolonger la viabilité cellulaire. Quelques ajouts ponctuels de nutriments en cours de culture ont par contre permis d'augmenter la concentration cellulaire maximale. Tous ces résultats montrent

que l'effet de la PYC aux niveau de la croissance et de la productivité dépend de la lignée cellulaire, mais aussi du mode de culture. On peut aussi en conclure que les améliorations les plus significatives sont atteintes lorsque les cellules sont cultivées dans un environnement contenant un apport supplémentaire de nutriments au cours de la culture. A tout le moins, nos résultats et toutes ces études s'accordent sur le fait que cette transformation entraîne une réduction significative de la production de lactate.

En comparant avec les résultats générés en flacons, il est clair que la stratégie de contrôle dynamique et l'environnement contrôlé du bioréacteur ont été bénéfiques pour les cellules 293-F5, car elles ont permis de prolonger encore plus la culture et d'augmenter la productivité spécifique. Ces effets sont fort probablement attribuables au contrôle du pH et de l'oxygène, mais peut être aussi aux variations moins brusques de l'osmolarité en raison de l'ajout plus continu de solution d'alimentation (Lu, Toh et al. 2013). Pour les cellules parentales, cette stratégie a engendré une diminution de la concentration en produit final par rapport au mode batch. Ce résultat s'explique probablement par l'augmentation continue du lactate en cours de culture qui a causé des conditions défavorables à la production en atteignant des niveaux potentiellement inhibiteurs. Cette augmentation spectaculaire du lactate n'a pas été observée lors de l'expérience fed-batch en flacons. Ce qui suggère que la conversion du pyruvate en lactate ne dépend pas seulement de la disponibilité du glucose dans le milieu, mais peut aussi être inhibée par un facteur qui n'était pas contrôlé à petite échelle (par exemple le pH ou le  $pO_2$ ).

La consommation d'oxygène similaire pour les deux clones suggère que le cycle TCA est sollicité de la même façon. Ces résultats n'appuient donc pas le schéma réactionnel proposé par Irani (Irani, Wirth et al. 1999) et présenté au chapitre 1, car l'activité de la mitochondrie ne semble pas affectée. Ainsi, les changements observés dans le métabolisme des cellules exprimant la PYC sont probablement dus à une réduction de la concentration cytosolique du pyruvate. En effet, il est probable que la pyruvate carboxylase entre en compétition avec la lactate déshydrogénase et diminue la disponibilité du pyruvate réduisant par le fait même la production de lactate. Cette réduction viendrait affecter la consommation de glucose et de glutamine par un mécanisme de rétro-inhibition encore flou (Fogolín, Wagner et al. 2004). Il demeure difficile de confirmer cette hypothèse, car la littérature ne s'accorde pas à ce sujet. D'abord, dans les cellules BHK-21, une augmentation de la conversion du glucose en  $CO_2$  et de la concentration d'ATP dans les cellules suggéraient une augmentation de l'activité du TCA (Irani, Wirth et al. 1999).

Dans une culture réalisée avec les cellules utilisées dans ce mémoire, une étude des flux métabolique a permis de confirmer la présence d'un flux significatif du pyruvate en oxaloacétate (Henry and Durocher 2011). Toutefois, il n'a pas pu être établi si ce flux a une incidence sur l'activité mitochondriale ou s'il ne fait qu'accentuer d'autres flux cytosoliques (e.g. voie de l'acide maléique).

Des études antérieures ont démontré que l'interféron produit par la lignée utilisée est correctement glycosylé (Loignon, Perret et al. 2008), à tout le moins en mode batch. Par contre, les conditions du milieu en mode fed-batch sont considérablement différentes; Les concentrations de déchets métaboliques sont supérieures en fin de culture. L'ammoniac surtout est bien connue pour son impact sur la glycosylation (Yang and Butler 2000). Or, comme les concentrations de métabolites secondaires sont plus basses dans les cultures de cellules 293-F5, on peut s'attendre à ce que les protéines recombinantes obtenues soient bien glycosylées et actives biologiquement. L'effet sur la glycosylation de l'expression de la PYC n'a toutefois par encore été démontré.



## CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce projet visait à maximiser la croissance et la productivité de cellules HEK293 exprimant la pyruvate carboxylase en mode fed-batch. Une stratégie d'alimentation dynamique et la culture en bioréacteurs ont permis de maximiser, non seulement, la croissance des cellules 293-F5, mais aussi d'obtenir un rendement d'interféron- $\alpha 2\beta$  près de 2,6 fois supérieures aux conditions initiales en mode batch à petite échelle. Pour ce faire, les différences métaboliques des lignées 293-D9 et 293-F5 ont d'abord été étudiées en mode batch dans des flacons. Ensuite, une solution d'alimentation capable de prolonger la phase de croissance cellulaire a été mise au point. Parallèlement, une méthode de contrôle prédictive a permis d'améliorer la stratégie d'alimentation afin de réduire l'accumulation de nutriments. Enfin, l'automatisation de cette stratégie et la mise à l'échelle du procédé dans un bioréacteur de 2L ont réussi à traduire cette augmentation de la quantité de cellules en amélioration de la production de protéine recombinante. Les expériences réalisées ont aussi montré que les mécanismes d'action de l'enzyme cytosolique ne sont peut-être pas ceux qui étaient suggérés jusqu'à maintenant. L'interféron est produit à une haute concentration, en plus d'être probablement plus homogène au niveau de la glycosylation, car chaque cellule produit moins de déchets métaboliques. Il serait intéressant de vérifier que la glycosylation est effectivement faite adéquatement et si l'interféron produit est biologiquement actif. En effet, l'avantage de produire l'interféron dans les cellules HEK293 est justement que cette méthode permet d'obtenir directement une forme bien repliée et active.

Nous avons développé une stratégie qui permettait de maximiser la croissance des cellules 293-F5 en mode fed-batch et avons obtenu conséquemment une plus grande production de protéine recombinante. Or, à la lumière des résultats obtenus, d'autres approches seraient peut-être envisageables pour obtenir de plus grandes concentrations en produit.

En premier lieu, il pourrait être intéressant de modifier la stratégie appliquée en séparant le procédé en deux phases distinctes : croissance et production. La phase de croissance a été *a priori* maximisée à l'aide de notre stratégie. Celle-ci peut donc être utilisée jusqu'à l'obtention de d'une concentration cellulaire maximale. Une fois cet objectif atteint, des changements pourraient être apportés aux conditions de cultures afin de stimuler spécifiquement la production de protéines recombinantes. Un changement de température pourrait être effectué afin de ralentir ou

d'arrêter complètement la croissance, maintenir la viabilité plus longtemps et, au final, augmenter le rendement des cultures. Il serait aussi possible d'utiliser un système inductible de production de la protéine. Toutefois, cette approche est beaucoup plus complexe et requiert une ingénierie cellulaire qui pourrait elle aussi avoir des effets sur le métabolisme des cellules.

La boucle de contrôle utilisée dans le cadre de ces travaux s'est avérée capable de maintenir un point de consigne avec un assez bon degré de précision. Il serait donc relativement facile de maintenir une concentration beaucoup plus faible de glucose et/ou de glutamine en modifiant légèrement le montage et/ou la solution d'ajout. Ainsi, on pourrait voir si l'exposition prolongée à une faible concentration de nutriments permet d'observer le fameux « shift métabolique » observé dans plusieurs lignées cellulaires. Il est possible que ce changement n'ait pas lieu étant donné que le métabolisme des cellules exprimant la PYC est déjà plus efficace que celui de la lignée parentale. Toutefois, il est possible que les effets observés soient encore plus prononcés dans ces conditions. Il serait aussi intéressant de voir si, dans de telles conditions, les cellules parentales sont capables d'exhiber un métabolisme similaire à celui des cellules 293-F5. Pour la lignée parentale, l'utilisation d'une boucle de contrôle basée sur la consommation du lactate pourrait même être tentée, ce qui devrait réduire considérablement les niveaux de lactate observés.

La composition de la solution d'alimentation pourrait aussi être modifiée en fonction de la production spécifique, plutôt que la croissance. Ainsi, peut être qu'une solution contenant un mélange d'acides aminés et de vitamines permettrait d'augmenter la productivité spécifique tout en maintenant une bonne croissance cellulaire, ce qui se traduirait par une augmentation de la concentration de produit désiré. Les hydrolysats semblent aussi stimuler la production de protéines recombinantes au vu de plusieurs études dans la littérature, il serait donc intéressant de s'y attarder.

L'établissement d'un modèle décrivant le comportement des cellules pourrait aussi aider à optimiser la stratégie d'alimentation. En effet, a priori rien n'indique que la stratégie d'alimentation est optimale pour la production. En utilisant un modèle et même une boucle de contrôle plus complexe capable d'estimer l'état du système à l'aide d'un observateur en temps réel il serait possible de fournir à tout moment les conditions optimales pour maximiser la production d'interféron. Par contre, implanter une telle stratégie requerrait au préalable de

développer un modèle adéquat et enfin de réaliser physiquement un montage capable d'alimenter chaque nutriment ou groupe de nutriments de façon individuelle.

Finalement, des études métaboliques plus poussées seraient pertinentes afin de vérifier si l'activité du cycle TCA est bel et bien identique entre les clones. La confirmation de cette donnée impliquerait toute une série de mécanismes permettant la rétro-inhibition des taux de consommation de glucose et de glutamine jusqu'à maintenant peu connue. Une suggestion serait de compléter les mesures de consommation d'oxygène par une mesure du taux de production de CO<sub>2</sub> par les cellules transformées.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Absi, N. R., B. M. Kenty, et al. (2011). "Real time monitoring of multiple parameters in mammalian cell culture bioreactors using an in-line Raman spectroscopy probe." Biotechnology and Bioengineering **108**(5): 1215-1221.
- Aehle, M., A. Kuprijanov, et al. (2011). "Increasing batch-to-batch reproducibility of CHO cultures by robust open-loop control." Cytotechnology **63**(1): 41-47.
- Aehle, M., S. Schaepe, et al. (2011). "Simple and efficient control of CHO cell cultures." Journal of Biotechnology **153**(1-2): 56-61.
- Ahn, W. S. and M. R. Antoniewicz (2011). "Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry." Metabolic Engineering **13**(5): 598-609.
- Ahn, W. S. and M. R. Antoniewicz (2013). "Parallel labeling experiments with [1,2-<sup>13</sup>C]glucose and [U-<sup>13</sup>C]glutamine provide new insights into CHO cell metabolism." Metabolic Engineering **15**(0): 34-47.
- Altamirano, C., A. Illanes, et al. (2006). "Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose." Journal of Biotechnology **125**(4): 547-556.
- Altamirano, C., C. Paredes, et al. (2000). "Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine." Biotechnology Progress **16**(1): 69-75.
- Altamirano, C., C. Paredes, et al. (2004). "Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium." Journal of Biotechnology **110**(2): 171-179.
- Andersen, D. C. and C. F. Goochee (1995). "The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells." Biotechnol Bioeng **47**(1): 96-105.
- Becker, T., B. Hitzmann, et al. (2007). Future Aspects of Bioprocess Monitoring. White Biotechnology. R. Ulber and D. Sell, Springer Berlin Heidelberg. **105**: 249-293.
- Bell, S. L., C. Bebbington, et al. (1995). "Genetic engineering of hybridoma glutamine metabolism." Enzyme and Microbial Technology **17**(2): 98-106.
- Berrios, J., C. Altamirano, et al. (2011). "Continuous CHO cell cultures with improved recombinant protein productivity by using mannose as carbon source: Metabolic analysis and scale-up simulation." Chemical Engineering Science **66**(11): 2431-2439.
- Berrios, J., A. Díaz-Barrera, et al. (2009). "Relationship between tissue plasminogen activator production and specific growth rate in Chinese Hamster Ovary cells cultured in mannose at low temperature." Biotechnology Letters **31**(10): 1493-1497.
- Bibila, T. A. and D. K. Robinson (1995). "In Pursuit of the Optimal Fed-Batch Process for Monoclonal Antibody Production." Biotechnology Progress **11**(1): 1-13.
- Birch, J. R. and A. J. Racher (2006). "Antibody production." Advanced Drug Delivery Reviews **58**(5-6): 671-685.

- Bloemkolk, J.-W., M. R. Gray, et al. (1992). "Effect of temperature on hybridoma cell cycle and MAb production." Biotechnology and Bioengineering **40**(3): 427-431.
- Bonarius, H. P. J., A. Ozemre, et al. (2001). "Metabolic-flux analysis of continuously cultured hybridoma cells using (CO<sub>2</sub>)-C-13 mass spectrometry in combination with C-13-lactate nuclear magnetic resonance spectroscopy and metabolite balancing." Biotechnology and Bioengineering **74**(6): 528-538.
- Borys, M. C., D. I. H. Linzer, et al. (1994). "Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner." Biotechnology and Bioengineering **43**(6): 505-514.
- Butler, M. (2005). "Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals." Applied Microbiology and Biotechnology **68**(3): 283-291.
- Cannizzaro, C., R. Güçerli, et al. (2003). "On-line biomass monitoring of CHO perfusion culture with scanning dielectric spectroscopy." Biotechnology and Bioengineering **84**(5): 597-610.
- Chee Fung Wong, D., K. Tin Kam Wong, et al. (2005). "Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures." Biotechnology and Bioengineering **89**(2): 164-177.
- Chen, K., Q. Liu, et al. (2001). "Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production." Biotechnol Bioeng **72**(1): 55-61.
- Chong, L., M. Saghafi, et al. (2013). "Robust on-line sampling and analysis during long-term perfusion cultivation of mammalian cells." Journal of Biotechnology **165**(2): 133-137.
- Cruz, H. J., C. M. Freitas, et al. (2000). "Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells." Enzyme and Microbial Technology **27**(1-2): 43-52.
- Cruz, H. J., J. L. Moreira, et al. (1999). "Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells." Biotechnology and Bioengineering **66**(2): 104-113.
- DeBerardinis, R. J., A. Mancuso, et al. (2007). "Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19345-19350.
- Dietmair, S., L. K. Nielsen, et al. (2011). "Engineering a mammalian super producer." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **86**(7): 905-914.
- Dochain, D. (2008). Bioprocess control. Hoboken, NJ, John Wiley & Sons.
- Dong, J., C. F. Mandenius, et al. (2008). "Evaluation and optimization of hepatocyte culture media factors by design of experiments (DoE) methodology." Cytotechnology **57**(3): 251-261.
- Dowd, J. E., K. E. Kwok, et al. (2001). "Glucose-based optimization of CHO-cell perfusion cultures." Biotechnology and Bioengineering **75**(2): 252-256.
- Dowd, J. E., I. Weber, et al. (1999). "Predictive control of hollow-fiber bioreactors for the production of monoclonal antibodies." Biotechnology and Bioengineering **63**(4): 484-492.
- Durocher, Y. and M. Butler (2009). "Expression systems for therapeutic glycoprotein production." Current Opinion in Biotechnology **20**(6): 700-707.

- Elias, C. B., E. Carpentier, et al. (2003). Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and Trichoplusia ni insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme, American Chemical Society.
- Fitzpatrick, L., H. A. Jenkins, et al. (1993). "Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture." Appl Biochem Biotechnol **43**(2): 93-116.
- Fogolín, M. B., R. Wagner, et al. (2004). "Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells." Journal of Biotechnology **109**(1-2): 179-191.
- Frahm, B., P. Lane, et al. (2002). "Adaptive, Model-Based Control by the Open-Loop-Feedback-Optimal (OLFO) Controller for the Effective Fed-Batch Cultivation of Hybridoma Cells." Biotechnology Progress **18**(5): 1095-1103.
- Frahm, B., R. Pörtner, et al. (2005). "Optimierung und Steuerung von Zellkultur-Fed-Batch-Prozessen mittels einer Kollokationsmethode." Chemie Ingenieur Technik **77**(4): 429-435.
- Frank, D., Y. Catherine, et al. (2008). "Applications of digital holographic microscopes with partially spatial coherence sources." Journal of Physics: Conference Series **139**(1): 012027.
- Gagnon, M., G. Hiller, et al. (2011). "High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures." Biotechnology and Bioengineering **108**(6): 1328-1337.
- Gálvez, J., M. Lecina, et al. (2012). "Optimization of HEK-293S cell cultures for the production of adenoviral vectors in bioreactors using on-line OUR measurements." Journal of Biotechnology **157**(1): 214-222.
- Gambhir, A., A. F. Europa, et al. (1999). "Alteration of cellular metabolism by consecutive fed-batch cultures of mammalian cells." Journal of Bioscience and Bioengineering **87**(6): 805-810.
- Gambhir, A., R. Korke, et al. (2003). "Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states." Journal of Bioscience and Bioengineering **95**(4): 317-327.
- Gawlitsek, M., U. Valley, et al. (1998). "Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells." Biotechnology and Bioengineering **57**(5): 518-528.
- Genzel, Y., J. B. Ritter, et al. (2005). "Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells." Biotechnology Progress **21**(1): 58-69.
- Gong, X., D. Li, et al. (2006). "Fed-batch culture optimization of a growth-associated hybridoma cell line in chemically defined protein-free media." Cytotechnology **52**(1): 25-38.
- Gorfien, S. F., W. Paul, et al. (2003). "Optimized nutrient additives for fed-batch cultures." Biopharm International **16**(4): 34-40.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.

- Graham, F. L. and A. J. Van Der Eb (1973). "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5." Virology **54**(2): 536-539.
- Hammett, K., J. Kuchibhatla, et al. (2007). Developing Chemically Defined Media Through DOE: Complete Optimization with Increased Protein Production in Less than 8 Months. Cell Technology for Cell Products. R. Smith, Springer Netherlands. **3**: 683-691.
- Heidemann, R., C. Zhang, et al. (2000). "The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells." Cytotechnology **32**(2): 157-167.
- Henry, O. and Y. Durocher (2011). "Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase." Metabolic Engineering **13**(5): 499-507.
- Henry, O., M. Jolicoeur, et al. (2011). "Unraveling the metabolism of HEK-293 cells using lactate isotopomer analysis." Bioprocess and Biosystems Engineering **34**(3): 263-273.
- Henry, O., A. Kamen, et al. (2007). "Monitoring the physiological state of mammalian cell perfusion processes by on-line estimation of intracellular fluxes." Journal of Process Control **17**(3): 241-251.
- Hong, J., S. Cho, et al. (2010). "Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells." Applied Microbiology and Biotechnology **88**(4): 869-876.
- Horton, H. R. (1993). Principles of biochemistry. Englewood Cliffs, NJ, N. Patterson Publishers.
- Hu, S., L. Deng, et al. (2011). "Bioprocess development for the production of mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor vIII antibody C12 by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells." Cytotechnology **63**(3): 247-258.
- Huang, E. P., C. P. Marquis, et al. (2007). "Development of Super-CHO protein-free medium based on a statistical design." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **82**(5): 431-441.
- Huang, Y. M., W. Hu, et al. (2010). "Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment." Biotechnol Prog **26**(5): 1400-1410.
- Hyun, S. and G. M. Lee (2007). "Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44)." Applied Microbiology and Biotechnology **76**(3): 659-665.
- Inoue, Y., Y. Tsukamoto, et al. (2010). "Efficient production of recombinant IgG by metabolic control and co-expression with GLUT5 in a fructose-based medium." Cytotechnology **62**(4): 301-306.
- Irani, N., A. J. Beccaria, et al. (2002). "Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells." Journal of Biotechnology **93**(3): 269-282.
- Irani, N., M. Wirth, et al. (1999). "Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction." Biotechnology and Bioengineering **66**(4): 238-246.

- Jan, D. C. H., D. A. Petch, et al. (1997). "The effect of dissolved oxygen on the metabolic profile of a murine hybridoma grown in serum-free medium in continuous culture." Biotechnology and Bioengineering **54**(2): 153-164.
- Jeong, D.-w., T. S. Kim, et al. (2001). "Blocking of Acidosis-Mediated Apoptosis by a Reduction of Lactate Dehydrogenase Activity through Antisense mRNA Expression." Biochemical and Biophysical Research Communications **289**(5): 1141-1149.
- Jiang, K. D., Z. Geng, et al. (2012). "Fed-Batch Cell Culture Process Optimization." BioProcess International **10**(3): 40-45.
- Kim, D. Y., M. A. Chaudhry, et al. (2013). "Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production." Biotechnology Progress **29**(1): 165-175.
- Kim, D. Y., J. C. Lee, et al. (2006). "Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody." Enzyme and Microbial Technology **39**(3): 426-433.
- Kim, H. S. and G. M. Lee (2007). "Differences in optimal pH and temperature for cell growth and antibody production between two Chinese hamster ovary clones derived from the same parental clone." J Microbiol Biotechnol **17**(5): 712-720.
- Kim, S. and G. Lee (2007). "Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin." Applied Microbiology and Biotechnology **74**(1): 152-159.
- Kiviharju, K., K. Salonen, et al. (2007). "On-line biomass measurements in bioreactor cultivations: comparison study of two on-line probes." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **34**(8): 561-566.
- Kurokawa, H., Y. S. Park, et al. (1994). "Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations." Biotechnology and Bioengineering **44**(1): 95-103.
- Kuystermans, D., A. Mohd, et al. (2012). "Automated flow cytometry for monitoring CHO cell cultures." Methods **56**(3): 358-365.
- Lanks, K. W. (1986). "Glutamine is responsible for stimulating glycolysis by L929 cells." J Cell Physiol **126**(2): 319-321.
- Lao, M. S. and D. Toth (1997). "Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture." Biotechnology Progress **13**(5): 688-691.
- Lecina, M., A. Soley, et al. (2006). "Application of on-line OUR measurements to detect action points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors." Journal of Biotechnology **125**(3): 385-394.
- Li, F., N. Vijayasankaran, et al. (2010). "Cell culture processes for monoclonal antibody production." mAbs **2**(5): 466-479.
- Lim, Y., N. S. C. Wong, et al. (2010). "Engineering mammalian cells in bioprocessing - Current achievements and future perspectives." Biotechnology and Applied Biochemistry **55**(4): 175-189.



- Loignon, M., S. Perret, et al. (2008). "Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN $\alpha$ 2b in HEK293 cells." BMC Biotechnol **8**: 65.
- Lu, F., P. C. Toh, et al. (2013). "Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development." Biotechnology and Bioengineering **110**(1): 191-205.
- Luo, J., N. Vijayasankaran, et al. (2012). "Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process." Biotechnology and Bioengineering **109**(1): 146-156.
- Male, K. B., P. O. Gartu, et al. (1997). "On-line monitoring of glucose in mammalian cell culture using a flow injection analysis (FIA) mediated biosensor." Biotechnology and Bioengineering **55**(3): 497-504.
- Maranga, L. and C. F. Goochee (2006). "Metabolism of PER.C6 cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels." Biotechnology and Bioengineering **94**(1): 139-150.
- Martinez, V. S., S. Dietmair, et al. (2013). "Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption." Biotechnol Bioeng **110**(2): 660-666.
- Meghrous, J., W. Mahmoud, et al. (2009). "Development of a simple and high-yielding fed-batch process for the production of influenza vaccines." Vaccine **28**(2): 309-316.
- Merten, O. W. (2002). "Virus contaminations of cell cultures - A biotechnological view." Cytotechnology **39**(2): 91-116.
- Mulukutla, B. C., M. Gramer, et al. (2012). "On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells." Metabolic Engineering **14**(2): 138-149.
- Neermann, J. and R. Wagner (1996). "Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells." Journal of Cellular Physiology **166**(1): 152-169.
- Oh, G. S., T. Izuishi, et al. (1996). "Interactive dual control of glucose and glutamine feeding in hybridoma cultivation." Journal of Fermentation and Bioengineering **81**(4): 329-336.
- Ozturk, S. S. and B. O. Palsson (1990). "Chemical Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media: Effect of Media Type, pH, and Serum Concentration." Biotechnology Progress **6**(2): 121-128.
- Ozturk, S. S., M. R. Riley, et al. (1992). "Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production." Biotechnol Bioeng **39**(4): 418-431.
- Pacis, E., N. Vijayasankaran, et al. (2010). "Systematic Approaches to Develop Chemically Defined Cell Culture Feed Media." Biopharm International **23**(11): 22-24,26-28,30,32.
- Paredes, C., E. Prats, et al. (1999). "Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering." Cytotechnology **30**(1-3): 85-93.
- Pelletier, F., C. Fonteix, et al. (1994). "Software sensors for the monitoring of perfusion cultures: Evaluation of the hybridoma density and the medium composition from glucose concentration measurements." Cytotechnology **15**(1): 291-299.

- Pendse, G. J. and J. E. Bailey (1994). "Effect of Vitreoscilla hemoglobin expression on growth and specific tissue plasminogen activator productivity in recombinant chinese hamster ovary cells." Biotechnol Bioeng **44**(11): 1367-1370.
- Petch, D. and M. Butler (1994). "Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization." J Cell Physiol **161**(1): 71-76.
- Portner, R., J. O. Schwabe, et al. (2004). "Evaluation of selected control strategies for fed-batch cultures of a hybridoma cell line." Biotechnol Appl Biochem **40**(Pt 1): 47-55.
- Reitzer, L. J., B. M. Wice, et al. (1979). "Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells." J Biol Chem **254**(8): 2669-2676.
- Schneider, M., M. E. Alaoui, et al. (1997). "Batch cultures of a hybridoma cell line performed with in situ ammonia removal." Enzyme and Microbial Technology **20**(4): 268-276.
- Schneider, M., I. W. Marison, et al. (1996). "The importance of ammonia in mammalian cell culture." Journal of Biotechnology **46**(3): 161-185.
- Seo, J., Y. Kim, et al. (2013). "Effect of culture pH on recombinant antibody production by a new human cell line, F2N78, grown in suspension at 33.0 °C and 37.0 °C." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(12): 5283-5291.
- Seth, G., P. Hossler, et al. (2006). Engineering Cells for Cell Culture Bioprocessing – Physiological Fundamentals. Cell Culture Engineering. W.-S. Hu, Springer Berlin Heidelberg. **101**: 119-164.
- Shaw, G., S. Morse, et al. (2002). "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells." FASEB J **16**(8): 869-871.
- Shuler, M. L. and F. Kargı (1992). Bioprocess engineering : basic concepts. Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall.
- Siegwart, P., J. Côté, et al. (1999). "Adaptive Control at Low Glucose Concentration of HEK-293 Cell Serum-Free Cultures." Biotechnology Progress **15**(4): 608-616.
- Spens, E. and L. Häggström (2007). "Defined protein and animal component-free NS0 fed-batch culture." Biotechnology and Bioengineering **98**(6): 1183-1194.
- Stoll, T. S., K. Mühlethaler, et al. (1996). "Systematic improvement of a chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production." Journal of Biotechnology **45**(2): 111-123.
- Swiech, K., A. Kamen, et al. (2011). "Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII." BMC Biotechnology **11**.
- Teixeira, A. P., R. Oliveira, et al. (2009). "Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative." Biotechnology Advances **27**(6): 726-732.
- Trummer, E., K. Fauland, et al. (2006). "Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors." Biotechnology and Bioengineering **94**(6): 1033-1044.
- Wlaschin, K. and W.-S. Hu (2006). Fedbatch Culture and Dynamic Nutrient Feeding. Cell Culture Engineering. W.-S. Hu, Springer Berlin Heidelberg. **101**: 43-74.

- Wlaschin, K. F. and W.-S. Hu (2007). "Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport." Journal of Biotechnology **131**(2): 168-176.
- Wlaschin, K. F. and W. S. Hu (2006). Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding. Cell Culture Engineering. W. S. Hu and T. Scheper. New York, Springer. **101**: 43-74.
- Xie, L. and D. I. C. Wang (1996). "High cell density and high monoclonal antibody production through medium design and rational control in a bioreactor." Biotechnology and Bioengineering **51**(6): 725-729.
- Yang, M. and M. Butler (2000). "Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation." Biotechnology and Bioengineering **68**(4): 370-380.
- Yoon, S. K., S. L. Choi, et al. (2005). "Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0°C." Biotechnology and Bioengineering **89**(3): 345-356.
- Zhang, H. F., H. B. Wang, et al. (2013). "Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody." Cytotechnology **65**(3): 363-378.
- Zhang, L., H. Shen, et al. (2004). "Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **79**(2): 171-181.
- Zhang, L., H. Shen, et al. (2004). "Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **79**(2): 171-181.
- Zhou, W. and W. S. Hu (1994). "On-line characterization of a hybridoma cell culture process." Biotechnol Bioeng **44**(2): 170-177.
- Zhou, W. and W. S. Hu (1994). Optimization of Fed-Batch Mammalian Cell Culture Processes. Advances in Bioprocess Engineering. E. Galindo and O. Ramírez, Springer Netherlands: 109-113.
- Zhou, W., J. Rehm, et al. (1995). "High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding." Biotechnology and Bioengineering **46**(6): 579-587.
- Zhou, W. C., J. Rehm, et al. (1997). "Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding." Cytotechnology **24**(2): 99-108.
- Zielke, H. R., C. M. Sumbilla, et al. (1980). "Lactate: a major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts." J Cell Physiol **104**(3): 433-441.

## ANNEXE 1 – Profil de croissance en fonction des différentes alimentations en maintenant le glucose ou la glutamine à des niveaux non limitants

